Aus: der Universitäts-Kinderklinik München
(Dr. von Haunersches Kinderspital)
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Betke
Abteilung für Antimikrobielle Therapie und
Infektionsimmunologie
Leiter: Prof. Dr. med. W. Marget

Das Verhalten der zellvermittelten Immunität bei Erkrankungen im Kindesalter unter besonderer Berücksichtigung von schweren Operationen.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
ALBERTI, Winfried
Quedlinburg

1978

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544728_0020

Aus: der Universitäts-Kinderklinik München
(Dr. von Haunersches Kinderspital)
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Betke

Abteilung für Antimikrobielle Therapie und Infektionsimmunologie
Leiter: Prof. Dr. med. W. Marget

Das Verhalten der zellvermittelten Immunität bei Erkrankungen im Kindesalter unter besonderer Berücksichtigung von schweren Operationen.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
ALBERTI, Winfried
Quedlinburg

Referent: Prof. Dr. Burghard Stück

Korreferent: Prof. Dr. I. Hoppe

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 3. 4. 1978

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A.	Einleitung	1
B.	Kurze Einführung in die Immunologie Über die körpereigene Abwehr	3
a.	Die nicht spezifische Immunität	3
b.	Die spezifische Immunität	5
C.	Lymphocytentransformation in vitro	8
I.	Das Transformationsphänomen	8
II.	Eigenschaften und Wirkungsweise des PHA	10
III.	Ultrastruktur der transformierten Zellen	11
IV.	Immunologische Gesichtspunkte der Lymphocyten-Transformation	11
V.	Weitere klinische Anwendungen des Lymphocytentransformations-Testes (LTT)	13
VI.	Übersicht über Kulturmethoden	14
VII.	Auswertungsverfahren	16
D.	Material und Methode	20
I.	Ansatz der Lymphocyten-Kulturen	20
a.	Makromethode	20
b.	Mikromethode	21
II.	Auswertung	24
a.	Packard-Liquid-Szintillations-Spektrometer	24
b.	Autoradiographie	24
III.	Verwendetes Arbeitsmaterial	26

		Seite
E.	Ergebnisse	28
	I. Klinische Fälle	28
	II. Operative Fälle	36
F.	Diskussion	53
G.	Zusammenfassung	62
	Literaturverzeichnis	65

Im Text verwendete Abkürzungen

L T T	Lymphozyten-Transformations-Test
M I F	migration inhibitory factor
P H A	Phytohämagglutinin
P W M	Pokeweed Mitogen
R E S	retikulo-endotheliales System

A. EINLEITUNG

Bakterielle Infektionen können zwar seit der Einführung, Weiterentwicklung und Neuentdeckung von Antibiotika in den meisten Fällen beherrscht werden, doch haben sie in der Kinderheilkunde, z. B. bei Frühgeborenen, Neugeborenen, bei Sepsis und Meningitis, so auch in der Neugeborenen-Chirurgie nicht an Bedeutung verloren. Trotz strengster steriler Kautelen, verfeinerter Operationsmethoden und modernster Laborteste sind bakterielle Infektionen besonders bei Operationen von längerer Dauer für den kindlichen Organismus noch immer die häufigste und gefürchtetste Komplikation, die innerhalb weniger Tage zum Tode führen kann.

Bei Neugeborenen und Säuglingen in den ersten Lebensmonaten führt die erhöhte Infektanfälligkeit besonders gegenüber gramnegativen Keimen oft zu einer Bakteriämie und Sepsis. So starben z. B. von 1967 - 1970 von 80 Neugeborenen nach risikoreichen Operationen in unserer Kinderchirurgischen Klinik allein 40 an bakteriellen Infektionen (19).

Bei der Suche nach einer Erklärung fanden wir Arbeiten von mehreren Autoren, die bei Erwachsenen mit dem sogenannten Lymphozyten-Transformations-Test (LTT) das Verhalten der zellvermittelten Immunität vor und nach Operationen untersucht hatten. Die Ergebnisse dieser Autoren geben einen Hinweis dafür, daß möglicherweise das Verhalten der immunkompetenten Zellen, d. h. der kleinen Lymphozyten, einen Schlüssel zum Verständnis der postoperativen Komplikationen darstellt. Wir wollten wissen, ob bei Kindern, insbesondere bei Neugeborenen, ein ähnliches Verhalten der kleinen Lymphozyten zu beobachten ist. Wir untersuchten die Funktion der Lymphozyten im LTT bei 34 Kindern (davon

6 Neugeborenen) im Alter bis zu 11 Jahren, die in der Kinderchirurgischen Klinik München in dem Zeitraum von Juli 1971 bis April 1972 einer Operation unterzogen worden sind.

Neben akuten postoperativen Infektionen können chronische Infektionen, insbesondere generalisierte Pilzerkrankungen, auch Leukozytosen unklarer Genese den Pädiater vor schwierige diagnostische und therapeutische Probleme stellen. Bekannt ist, daß bei primären und sekundären Immundefizienzen, darunter auch bei Defekten der zellvermittelten Immunität, chronische Infektionen mit Bakterien, Viren und Pilzen beobachtet werden. Dabei muß insbesondere an einen Defekt des immunologischen Systems gedacht werden.

Der LTT, den wir bei 19 Kindern mit chronischen Infekten, Leukozytosen unklarer Genese, Leukämien und bei einem Fall einer schweren kombinierten Immundefizienz vom Schweizer Typ anwendeten, erwies sich als eine geeignete Methode, um Defekte der zellvermittelten Immunität aufzudecken.

B. KURZE EINFÜHRUNG IN DIE IMMUNOLOGIE
Über die körpereigene Abwehr

Die körpereigene Abwehr beruht auf dem Zusammenspiel von Zellen und Organen, die die Fähigkeit besitzen, Fremdmaterial zu erkennen, es zu neutralisieren, zu eliminieren oder zu metabolisieren. Die Immunabwehr des Körpers kann man in 2 Hauptgruppen einteilen: in eine spezifische und eine nicht spezifische Immunität.

Nicht spezifische Antworten werden hervorgerufen bei einem Erstkontakt mit einem Fremdkörper, der ein Antigen oder Immunogen sein kann, wobei der Organismus zunächst nur eine Unterscheidung versucht zwischen Eigen- und Fremdsubstanz.

Spezifische Immunantworten dagegen werden ausschließlich beim Kontakt mit einem Antigen hervorgerufen, nicht aber z. B. mit einem Kohlepartikel, das nicht antigen wirksam ist.

Die große Vielfalt von Wirksystemen aus löslichen Serumfaktoren und verschiedenen Zelltypen und deren Mechanismen soll kurz skizziert werden.

a) Die nicht spezifische Immunität

Bei dieser Immunität spielt die passive Hautbarriere eine wichtige Rolle, ebenso andere Faktoren wie Schweiß, der Milchsäure enthält, die Talgsekrete (mit Fettsäuren), Lysozym, das Flimmerepithel und die mukösen Sekrete. Werden die Haut oder Schleimhaut von Mikroorganismen durchwandert, treten Serumfaktoren

und Zellen des retikulo-endothelialen-Systems (RES) in Funktion. Diese mononukleären Zellen mit dem Sammelbegriff Makrophagen phagozytieren Bakterien, Zelltrümmer, kolloidales Material und Makromoleküle.

Die Granulozyten, darunter besonders die neutrophilen (oder polymorphkernigen) Leukozyten, die vornehmlich die Aufgabe haben, hochvirulente Bakterien zu phagozytieren und intrazellulär abzutöten, heißen Mikrophagen. Für die Phagozytose notwendig ist der Entzündungsprozeß, der durch verschiedene von Lymphozyten gebildete Faktoren gefördert wird. Der migration-inhibitory-factor (MIF) wird durch den Antigen-Kontakt auf sensibilisierte Lymphozyten freigesetzt, besetzt die Oberfläche der Makrophagen und verhindert ihre Wanderung. Außerdem wurde ein macrophage spreading inhibitor, ein macrophage aggregator und phagocytosis-promoting factor beschrieben.

Die Serumproteine Properdin und Interferon besitzen viruzide, bzw. ersteres auch bakterizide Eigenschaften.

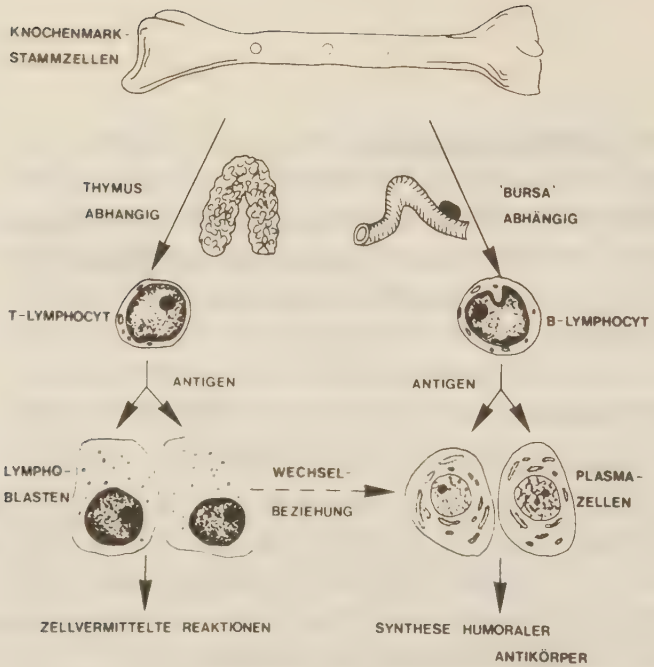
Das Komplement, ein enzymatisches System von Serumproteinen, spielt eine Rolle bei der Phagozytose, Opsonisation, Chemotaxis und Immunzytolyse.

b) Die spezifische Immunität

Diese Form der Immunität bedeutet, daß Antikörper (humorale Immunität) oder sensibilisierte Lymphozyten (zellvermittelte Immunität) ein Antigen spezifisch erkennen und mit diesem spezifisch reagieren.

Die Lymphozyten.

Die Lymphozyten unterscheiden sich von den bisher genannten Zellgruppen dadurch, daß sie mit dem Antigen spezifisch zu reagieren vermögen und spezifische Zellprodukte hervorbringen können. Lymphozyten sind runde Zellen von einem Durchmesser von 6 - 12 µ mit einem dichten, runden Kern, keinem sichtbaren Nukleolus und einem schmalen basophilen Zytoplasmasaum. Abb. 1 zeigt den Entwicklungsgang von der Knochenmark-Stammzelle über Thymus-abhängige (T-Lymphozyt) und Bursa-abhängige Lymphozyten (B-Lymphozyten) zu den Lymphoblasten bzw. den Plasmazellen. Die Einteilung in T-Lymphozyten und B-Lymphozyten beruht auf entwicklungsgeschichtlichen Vorstellungen, wonach die Entstehung der Lymphozyten, die an zellvermittelten Reaktionen teilnehmen, vom Thymus beeinflußt ist, und die Entwicklung von Plasmazellen, die Antikörper produzieren und abgeben, von "Bursa-Fabricii-äquivalenten" Geweben determiniert wird. Das Organ, das bei den Hühnern die Plasmazellen in ihrer Entwicklung durchlaufen, heißt Bursa Fabricii. Beim Menschen hat man bisher ein ähnliches Organ nicht gefunden. Gleichwohl lassen tierexperimentelle Untersuchungen ein Vorhandensein von ähnlichen Geweben (und deren Faktoren) vermuten.



Schema nach ROITT (59)

Abb. 1: Der Entwicklungsgang der Lymphozyten.

Die Lymphozyten, deren Verhalten in unserer Arbeit untersucht wurde, werden im zirkulierenden Blut, in der Lymphe und in thymusabhängigen Anteilen der Lymphknoten gefunden. Zwischen diesen Strukturen besteht eine dauernde Zirkulation. Der zirkulierende "Pool" der Lymphozyten ist durch eine lange Überlebensdauer gekennzeichnet, und man glaubt, daß es sich bei ihnen um sogenannte "Gedächtniszellen" handelt.

"Zellvermittelte" Immunität umfaßt die immunologischen Vorgänge, bei denen kleine Lymphozyten Antigene erkennen und mit ihnen reagieren. "Zelluläre" Immunität ist ein historisch bedingter Begriff.

Ebenfalls zur Gruppe der "spezifischen Abwehr" zählen die humoralen Antikörper im Serum, in der Lymphe und Gewebsflüssigkeit. Diese bilden eine Gruppe von strukturverwandten Proteinen, den Immunglobulinen und werden von den Plasmazellen gebildet, die damit Hauptzellen der humoralen Immunität werden.

Ausführlichere Übersichtsarbeiten zum Thema der "Körpereigenen Abwehr" können dem Literaturverzeichnis entnommen werden (14, 27, 34, 40, 60, 72).

C. LYMPHOCYTENTRANSFORMATION IN VITRO

I. Das Transformationsphänomen

Wenn periphere Blutleukozyten nach Zusatz von AB-Serum und einem Kulturmedium einige Tage bei 37 ^{o} C im Brutschrank inkubiert werden, degenerieren die polymorphkernigen Leukozyten, während eosinophile Leukozyten, Monozyten und Lymphozyten überleben.

Fügt man eine definierte Menge Phytohämagglutinins, eines Extraktes der gemeinen Bohne, dazu, beobachtet man große Zellen mit großen Zellkernen und gut sichtbaren Nucleoli. Am dritten oder vierten Tag sind dann Zellen in Mitose nachzuweisen. Dieses Phänomen wurde zuerst von HUNGERFORD et al. (28) und NOWELL (50) beschrieben.

In der Literatur werden die großen, aktiven Zellen verschieden bezeichnet: als Blastzellen, blastoide, transformierte, stimulierte oder aktivierte Zellen.

CARSTAIRS (6) zeigte als erster, daß die kleinen Lymphozyten Ursprung dieser sich teilenden Zellen sind.

YOFFEY et al. haben den Vorgang der Transformation und Mitose ausführlich beschrieben (80):

Zu Beginn findet man in der Kultur eine ungefähr gleich große Anzahl von kleinen Lymphozyten und von Zellen mit dem typischen "wolkigen" Kern, die man gewöhnlich als mittelgroße oder große Lymphozyten bezeichnet. 24 Stunden nach Zugabe von Phytohämag-

glutinin (PHA) sind schon einige blastoide Zellen vorhanden. Es erscheinen Lymphozyten im Übergangsstadium mit einem hohen Quotienten aus Nucleolus zu Zytoplasma. Nach 48 Stunden scheinen kleine und große Lymphozyten vermindert. Übergangszellen und viele blastoide Zellen sind vorhanden. Zum erstenmal sieht man mitotische Zellen in großer Zahl. Nach 72 Stunden bestehen viele Mitosen und zahlreiche größere blastoide Zellen. Das Maximum der Mitoserate liegt zwischen dem 3. und 5. Tage.

Ebenso wie PHA vermag ein spezifisches Antigen in einer Lymphozyten-Kultur eine Transformation auszulösen, nur ist hier die Anzahl der transformierten Zellen geringer. Außerdem ist bei der spezifischen Stimulation der Erstkontakt des Antigens in vivo unbedingte Voraussetzung. Die Transformation mit spezifischen Antigenen ist wie mit PHA dosisabhängig, d. h. es gibt eine optimale Antigen-Konzentration ober- und unterhalb der die Transformation vermindert ist (18).

In der folgenden Übersicht sind einige spezifische Antigene und unspezifische Mitogene zusammengestellt.

Beispiele nicht spezifischer Stimuli:

Phytohämagglutinin (P.H.A.)	(39)
Pokeweed Mitogen (P.W.M.)	(12)
Streptolysin S	(24)
Staphylococcen-Filtrat	(41)
Antigen-Antikörper-Komplexe	(25, 48)
Antilymphozyten-Serum	(17)

Beispiele spezifischer Stimuli:

Tuberkulin (P. P. D.)	(56)
Tetanustoxin	(11)
Streptolysin 0	(24)
Verschiedene Endotoxine	(52)
Penicillin und Derivate	(24)
Pollen	(44)

Aspirin, Antibiotika und verschiedene Medikamente (18)

II. Eigenschaften und Wirkungsweise des Phytohämagglutinins

Bis zur Entdeckung der mitogenen Eigenschaften auf periphere Blutlymphozyten war PHA benutzt worden, um Erythrozyten zu agglutinieren (37). RIGAS und OSGOOD hatten wenige Jahre zuvor, 1955, eine Methode zur Reindarstellung beschrieben (59). HURN isolierte 1966 ein sehr wirksames PHA und charakterisierte es als ein wasserlösliches Protein mit einem Molekulargewicht von 118000, das reich an Asparaginsäure und Aminosäuren ist und ungefähr 10 % Kohlenhydrate enthält (29).

Wirkungsweise.

Obwohl das PHA seit über 10 Jahren für Lymphozytenkulturen benutzt wird, ist das Wirkprinzip der Transformation und Mitose noch nicht sicher bekannt. Verschiedene biochemische Veränderungen in den Zellen wurden beschrieben. PHA in Lymphozytenkulturen führt in der stimulierten Zelle zu einem Anstieg der Protein- und Ribonukleinsäure-Synthese. Besonders die Produktion der ribosomalen RNS, die dann zu einer DNS-Bildung in den Zellkernen führt, ist erhöht (8, 35). Nach einer Hemmung der r-RNS-Synthese mit Actinomycin D findet eine DNS-Synthese nicht mehr

statt (35). Die r-RNS-Synthese ist also unentbehrlich für die DNS-Bildung. Die Produktion von Protein könnte ein Regulationsmechanismus sein, der das Einsetzen des Lymphozytenwachstums kontrolliert, wodurch die Bildung von Ribosomen gesteuert wird, die wiederum für eine Zellvergrößerung notwendig sind. Diesen Schluß kann man ziehen, nachdem der Anstieg der r-RNS-Synthese eine gleichzeitige Proteinsynthese erfordert (8).

III. Ultrastruktur der transformierten Zellen

INMAN und COOPER (30) konnten 1963 zeigen, daß in den mit PHA stimulierten Zellen die Mitochondrien zahlreich waren. Der Golgi-Apparat war hochentwickelt. Die hervorstechendste Veränderung des Zytoplasmas war der erhöhte Gehalt an Ribosomen, Kennzeichen für eine aktive Proteinsynthese. Diese wurde zusammen mit dem hochentwickelten Golgi-Apparat als Beweis für eine verstärkte Zellteilung aufgefaßt.

SELL et al. fanden, daß nach einer Stimulation von peripheren Rattenlymphozyten durch PHA innerhalb von 48 Stunden folgende Ereignisse ablaufen: Proteinsynthese, RNS-Synthese, histologische Blasttransformation und DNS-Synthese (69).

IV. Immunologische Gesichtspunkte der Lymphozyten-Transformation

Eine wichtige Frage ist, ob die Lymphozyten-Transformation eine Indikator-Reaktion für einen immunologischen Vorgang ist.

Folgendes spricht dafür: Die Morphologie der blastoiden Zellen, die mit PHA stimuliert wurden, ist denen ähnlich, die mit einem spezifischen Antigen inkubiert wurden (30). Der auffallendste Unterschied ist ein weniger gut ausgebildetes endoplasmatisches Retikulum (47). Nur der kleine Lymphozyt wird durch PHA in vitro transformiert und besitzt alle Eigenschaften, die für eine Immunkompetenz notwendig sind (16). Diese Zelle ist fähig, eine Transformation unter einer Vielzahl von stimulierenden Substanzen in vitro und in vivo durchzumachen. In vivo wurde die Transformation bei der Kontaktallergie (55, 74), bei der "Transplantat-gegen-den-Wirt-Reaktion" (engl. graft-versus-host-reaction) (16) und bei der Hauttransplantatabstoßung (68) beobachtet. Die Morphologie der Blastzellen, die bei diesen Immunreaktionen entstehen, ähnelt im hohen Maße derjenigen der mit PHA stimulierten Zellen (76, 16). Außerdem besteht bei verschiedenen Krankheitsbildern eine Korrelation zwischen einer herabgesetzten Reaktion vom verzögerten Typ in vivo (z. B. beim Hauttest) und der herabgesetzten Transformierbarkeit der Lymphozyten in vitro (49, 53). Früher glaubte man, daß der migration-inhibitory-factor (MIF) nur bei Kontakt von spezifischen Antigenen mit sensibilisierten Lymphozyten freigesetzt würde (DUMONDE et al., 1969). Heute weiß man, daß der MIF und andere lösliche Serumfaktoren durch die Wirkung von PHA und Con A auf nicht immunisierte Lymphozyten entstehen (zitiert nach 42, S. 203).

Alle diese Befunde weisen darauf hin, daß die PHA-Stimulation kleiner Lymphozyten ein Indikator für immunologische Prozesse zu sein scheint.

Allerdings gibt es auch Fakten, die dieser Annahme widersprechen:

Mit PHA stimulierte Kulturen zeigen nach ca. 3 Tagen einen Prozentgehalt an transformierten Zellen von 70 - 90 %, während in den mit spezifischen Antigenen stimulierten Kulturen nur 5 - 30 % der Zellen nach 7 - 10 Tagen transformiert werden (2). Weiterhin spricht gegen eine immunologische Basis der PHA-Stimulation, daß die in-vitro-Transformation mit PHA nicht die Anwesenheit von Makrophagen erfordert (10, 51), während Makrophagen für die Antigen-induzierte Blastenantwort notwendig sind (20, 32). Trotzdem erscheint uns der Lymphozyten-Transformations-Test mit PHA ein brauchbarer Suchtest zu sein, um Defekte der zellvermittelten Immunität auszuschließen.

V. Weitere klinische Anwendungen des LTT

Der LTT ist eine wichtige diagnostische Methode zum Nachweis eines Allergens geworden (18, 21, 43). Der Test ist so empfindlich, daß 2 Jahre nach dem Abklingen der ersten Allergie die Lymphozyten-Transformation bei Arzneimittel-Allergikern noch positiv war (61). Der Grad der Blastogenese und Mitose zeigt das Vorhandensein und den Grad der Sensibilisierung an.

Eine weitere Anwendung des LTT wird von SCHEIFFARTH und WARNATZ (64) bei der Diagnose einer primär chronischen Polyarthritis berichtet. Als Antigen in der Lymphozyten-Kultur wirkt ein im Synovialextrakt enthaltenes unbekanntes Antigen. Die Autoren stellten eine Blastentransformation von ca. 16 % fest, während diese bei anderen Gelenkleiden infektiös entzündlicher und degenerativer Art weit darunter lag. Da eine Stimulation mit patienteneigenem Synovialextrakt erfolgte, muß bei der primär chronischen Polyarthritis das Vorliegen einer Autoaggressionskrankheit in Betracht gezogen werden.

BAIN et al. (3) beobachteten 1964, daß bei der Inkubation von Lymphozyten zweier nicht verwandter Spender in einer Kultur einige von ihnen sich in große basophile Zellen umwandelten, die DNS synthetisieren konnten und eine Mitose durchmachten. Diese Blastzellen, die man in dieser Lymphozyten-Mischkultur erhielt, ähnelten denen, die man bei der Inkubation mit PHA erhielt. Da der Gehalt an blastoiden Zellen nach der Inkubation mit der genetischen Verschiedenheit zu korrelieren scheint, wird die gemischte Lymphozyten-Reaktion als ein brauchbarer Histokompatibilitätstest angesehen. BAIN et al. waren die ersten, die eine Beziehung der gemischten Lymphozyten-Reaktion zur Transplantat-Immunität zeigten.

VI. Übersicht über Kulturmethoden

Die aus dem peripheren Venenblut des Patienten isolierten Lymphozyten werden in einem flüssigen Kulturmedium inkubiert. Meist wird wie schon von HUNGERFORD et al. (28) Parker 199 Medium verwendet. Dazu fügt man eine Antibiotika-Mischung von Penicillin und Streptomycin, die nach MELLMAN (46) die möglichen bakteriellen Verunreinigungen durch PHA verhindert. Ein weiterer Bestandteil der Kultur ist zellfreies Serum oder Plasma in einer Konzentration von 10 - 40 %. Bei dem häufig benutzten fötalen Kälberserum erhält man eine sogenannte "Hintergrund"-Stimulation, die 5 - 48 % betragen kann (31).

Das bedeutet, daß eine Transformation stattfindet, ohne daß PHA oder ein spezifisches Antigen hinzugefügt wurde. Besser ist es, autologes oder homologes Serum oder Plasma zu verwenden. Wenn homologes Serum gebraucht wird, nimmt man AB-Serum, das bei

-20 ^{o} C aufbewahrt werden kann, ohne die Wirkung auf das Zellwachstum zu verlieren. Wichtig ist es, im Inkubator eine bestimmte konstante Temperatur aufrechtzuhalten. Geringe Abweichungen von der optimalen Temperatur von 36 - 37 ^{o} C verändern das mitotische Wachstum ganz erheblich. Temperaturen zwischen 39 und 40 ^{o} C haben gewöhnlich das Zugrundegehen der Kultur zur Folge (NOWELL und HUNGERFORD, zitiert nach 46).

Von vielen Autoren wird eine 5 %ige CO_2-Atmosphäre für die Kulturen als günstig angesehen. Notwendig dazu ist ein besonderer Brutschrank. Eine gewisse CO_2-Konzentration kann man ebenfalls erreichen, wenn man die Kulturgläschen luftdicht abschließt. Selbstverständlich müssen die Kulturen unter sterilen Bedingungen verarbeitet werden. Nach der Entnahme von heparinisiertem venösen Blut kann entweder das Vollblut in die Kulturen gegeben werden oder man verwendet nach der Sedimentation der Erythrozyten das überstehende, leukozytenreiche Plasma. Ein Hilfsmittel zur besseren Sedimentation ist die Zugabe von 6 %igem Dextran zum Blut oder eine Zentrifugation bei 500 U/Min. Kleinere Mengen Erythrozyten in Leukozyten-Suspensionen stören die Mitose der Lymphozyten nicht (36). Ebenso wenig verändert die Zugabe von Granulozyten zu reinen Lymphozyten-Kulturen, die mit PHA stimuliert wurden, die Aufnahme von ^{14}C-Thymidin signifikant (65).

Meist wird eine bestimmte Anzahl (1 - 2 x 10^{6}) mononukleärer Zellen in eine Kultur gegeben. Im allgemeinen sind die Antworten in Lymphozyten-Kulturen, die andere weiße Blutzellen enthalten, höher als in Kulturen mit reinen Lymphozyten-Kulturen, die man u. a. durch Filtration durch Säulen mit Glaskügelchen erhält (45). Da das Ergebnis der Lymphozyten-Stimulation weder durch Erythrozyten noch durch Granulozyten erheblich beeinflußt wird, ha-

ben wir uns die technisch und zeitlich aufwendige Arbeit erspart, reine Lymphozyten-Suspensionen herzustellen. LEVIS und ROBBINS (39) fanden bei Kulturen mit reinen Lymphozyten, daß das Maximum der DNS-Synthese, das bei normalen Leukozyten-Kulturen bei 84 Stunden lag, zu einem späteren Zeitpunkt erfolgte.

Ebenfalls zu Beginn der Kultur wird das entsprechende Mitogen oder spezifische Antigen zur Stimulation der Blastogenese dazugegeben. Die Auswertung der Kultur erfolgt nach 3 - 5 Tagen bei einer PHA-Kultur und nach 5 und mehr Tagen bei Kulturen, die mit einem spezifischen Antigen angesetzt wurden.

VII. Auswertungsverfahren

Die meisten Auswertungsverfahren machen sich die Tatsache zunutze, daß in den durch Mitose entstehenden Lymphozytenkernen DNS entsteht und bei der Zugabe eines radioaktiven Vorläufers (z. B. des ^{3}H-Thymidins) dieser in die Chromosomen eingebaut wird. Neben der DNS-Synthese wird bei der Stimulation auch die RNS-Synthese in den Lymphozyten-Kulturen in Gang gesetzt. Bei der Zugabe des radioaktiv markierten ^{3}H-Uridins wird dieser Vorläufer in die RNS eingebaut (79). Ein radioaktiver Vorläufer des in den ersten 24 Stunden im Lymphoblasten gebildeten Proteins ist das ^{14}C-L-Leucin (78).

Die Radioaktivität aller dieser Stoffe, die zur Neubildung von DNS, RNS oder Protein benötigt werden, kann mit einem Liquid-Szintillations-Spektrometer in "counts" (= Impulsen) pro Minute gezählt werden. Damit erhält man zwar nicht die tatsächliche Zahl der stattgefundenen Mitosen, aber man hat bei Verlaufskontrollen ein

relatives Maß für die Veränderung der Reaktionsfähigkeit der kleinen Lymphozyten. Außerdem wird bei dieser Methode die Subjektivität des Untersuchers ausgeschaltet, die bei den folgenden Methoden eine große Fehlerquelle darstellt.

Wie wir gesehen haben, erfolgt nach der Stimulation mit PHA eine typische Umwandlung der kleinen Lymphozyten in blastoide oder lymphoblastische Zellen. Auf gefärbten Ausstrichen kann man die entstandenen Blasten zählen und das Verhältnis der transformierten Zellen zu den morphologisch nicht veränderten kleinen Lymphozyten bestimmen. Jedoch wird diese morphologische Methode nur noch selten durchgeführt, da die Lymphoblasten infolge ihrer aufgelockerten Struktur sehr leicht zu deformieren sind, und es außerdem vom subjektiven Urteil des Untersuchers abhängt, ob er eine Zelle bereits als Lymphoblast ansieht oder nicht.

Das subjektive Urteil des Betrachters spielt bei der "Autoradiographie" eine geringe Rolle. Bei dieser Methode werden die am Ende einer Kultur angefertigten Ausstriche mit einem "stripping"-Film überzogen, nach einer Expositionszeit von Tagen bis Wochen im Ganzen entwickelt und dann wie üblich nach PAPPENHEIM gefärbt. Die im Kern der Lymphoblasten eingebauten Isotopen belichten an entsprechenden Stellen den dicht anliegenden Film, so daß die Zellkerne, in denen z. B. ^{3}H-Thymidin eingebaut wurde, durch schwarz abgebildete Silbergranula imponieren. Die so markierten Lymphoblasten können leicht von nicht markierten unterschieden werden, in denen keine DNS-Synthese stattgefunden hat. Pro Objektträger werden im allgemeinen 100 oder mehr Zellen ausgezählt. Die Autoradiographie ist heute vor allem ein wichtiger Bestandteil von Chromosomenuntersuchungen geworden und wurde 1950 von DONIACH und PELC eingeführt (9). Die Methode

eignet sich besonders für die Auswertung von Mikrokulturen. Die Abb. 2 zeigt einen nach dieser Methode behandelten Ausstrich mit markierten Blasten.

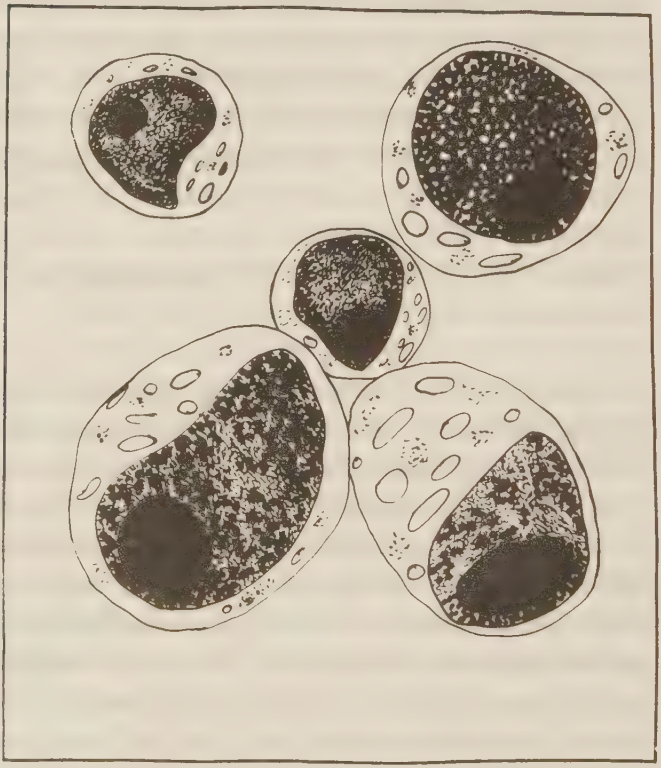


Abb. 2: Markierte Lymphoblasten eines autoradiographischen Präparates nach der Stimulation mit PHA am 5. Tag. In die neu gebildete DNS der Kerne wurde ^{3}H-Thymidin eingebaut.

Eine andere Auswertungsmethode wird von STEWART und INGRAM (71) angegeben. Die Zellen werden mit dem proteolytischen Enzym Pronase behandelt und die Zelltrümmer mit der zytolytischen Substanz Cetrimide beseitigt. Die intakt gebliebenen Kerne werden mit einem Coulter-Counter gezählt und deren Volumen bestimmt. Ein Anstieg im Kernvolumen ist charakteristisch für eine Antwort der Lymphozyten auf PHA. In Kontrollkulturen blieb das Kernvolumen über 72 Stunden konstant.

Erwähnt sei noch die Feulgen-Zytophotometrie, die u. a. von AMBS et al. verwendet wurde (1). Diese Methode dient zur Bestimmung der DNS-Menge in relativen Einheiten und gleichzeitig des mittleren Kerndurchmessers.

D. MATERIAL UND METHODE

I. Ansatz der Lymphocyten-Kulturen

a) Makromethode

Bei der verwendeten Makromethode nach SØRENSEN (70) benötigt man ca. 20 ml heparinisiertes Venenblut. Neben 200 IE Heparin werden in die Spritze zur besseren Sedimentation der Erythrozyten 2 ml Makrodex^{R} 6 % (Fa. Knoll, Ludwigshafen) hinzugefügt. Man läßt die Spritze etwa 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehen und spritzt dann das überstehende leukozytenreiche Plasma (buffy coat) in einen sterilen Erlenmeyerkolben. In einer Neubau-Kammer werden die mononukleären Zellen gezählt und deren Gesamtzahl im erhaltenen Plasma errechnet. Pro Kultur werden 0,02 ml Antibiotic-mixture (Fa. Difco Laboratories, Detroit, USA) und 0,4 ml inaktiviertes menschliches AB-Plasma der leukozytenreichen Suspension zugegeben. Mit dem Medium TC 199 Difco wird dann aufgefüllt, so daß eine Kultur 2 ml Endvolumen enthält. Die Kulturen werden in sterile, verschließbare, unten abgerundete Zentrifugengläser gegeben, die bei 36 - 37 ^{o} C inkubiert werden.

Die Kulturen, denen wir beim Ansatz ein Candida- oder ein Escherichia-Coli-Mischantigen zusetzten, wurden 5 Tage, die Kulturen mit PHA 3 Tage inkubiert. Die Kontrollkulturen blieben frei von Antigen oder PHA. Sie wurden zusammen mit den entsprechenden Ansätzen an diesen Tagen ausgewertet. Von den Zwei- bis Fünffachkulturen berechneten wir das Mittel. 6 - 7 Stunden vor der Auswertung wurde in alle Kulturen 1 μCi ^{3}H-Thymidin (Fa. Amersham/Searle, Des Plaines, USA) mit einer spezifischen Aktivität von 5 Ci pro mMol hinzugegeben. Die Mitose konnte man stoppen, indem man die Gläser in ein Eisbad stellte unter Zugabe von "kaltem" Thymidin. Die Auswertung erfolgte mit der Millipore-

Filter-Technik, wie sie bereits von BURR (4) in unserem Laboratorium durchgeführt wurde.

Nach der beschriebenen Methode untersuchten wir die Reaktionsfähigkeit peripherer kleiner Blutlymphozyten von 5 Patienten, deren Ergebnisse in Tabelle Nr. II a zusammengefaßt sind. Es handelte sich um Patienten im Alter von 1/2 - 7 Jahren, bei denen aufgrund einer chronischen mucocutanen Candidiasis ein Defekt der zellvermittelten Immunität vermutet wurde.

Die Methode nach SØRENSEN erfordert ca. 20 ml Blut. Diese Menge konnten wir bei wiederholten Entnahmen vor und nach einer Operation weder älteren Kindern noch Säuglingen entnehmen, ohne diese Kinder zu gefährden. Wir mußten deshalb eine Methode finden, bei der wir nur kleine Mengen Blut benötigten.

b) Mikromethode

Wir modifizierten eine solche sogenannte Mikro-Methode, die JUNGE et al. angaben (33). Die beiden Abbildungen Nr. 3 und Nr. 4 zeigen die Schritte vom Ansatz bis zur Auswertung der Kultur mit dem Packard-Liquid-Szintillations-Spektrometer.

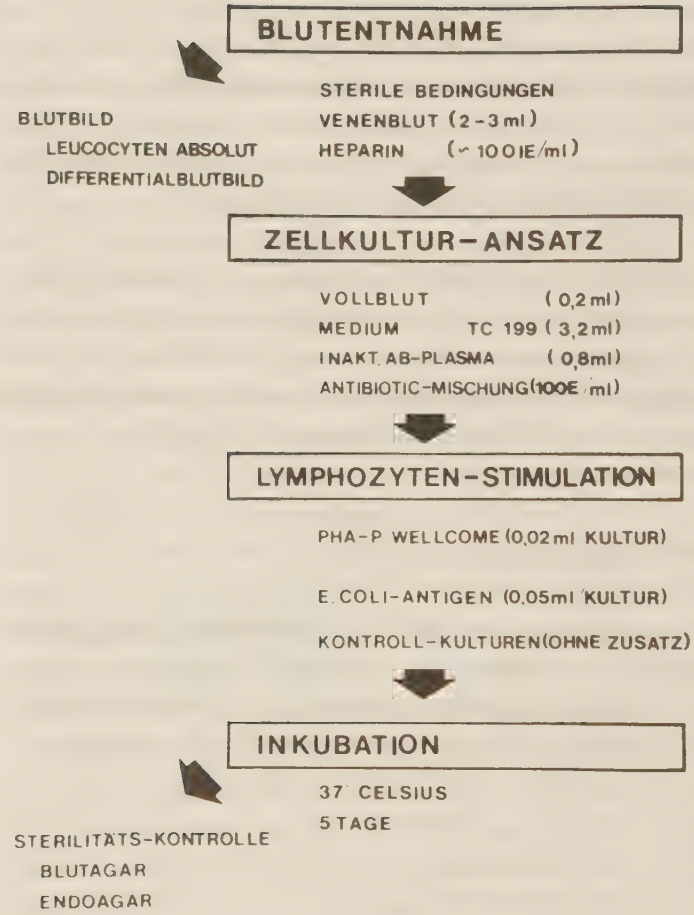


Abb. 3: Ansatz der Lymphozyten-Kultur modifiziert nach JUNGE et al. (33).

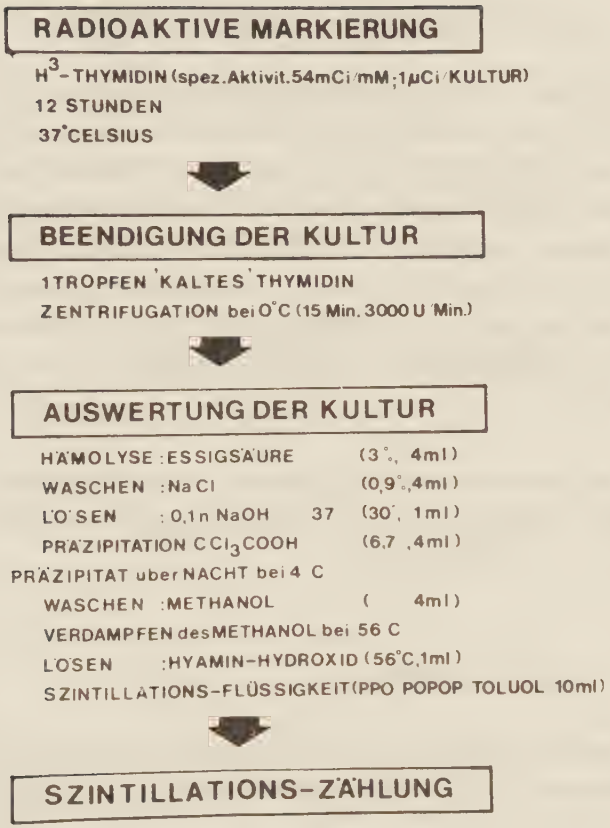


Abb. 4: Auswertung der Lymphozyten-Kultur modifiziert nach JUNGE et al. (33).

II. Auswertung

a) Packard-Liquid-Szintillations-Spektrometer

Während bei der Makromethode eine konstante Zahl von $1,5 \times 10^6$ mononukleären Zellen pro Kultur eingestellt wird, haben wir bei unserer Mikromethode keine Zellzählung durchgeführt. Bei einem Teil der Untersuchungen bestimmten wir jedoch die absolute Leukozytenzahl und fertigten ein Differential-Blutbild an. Die durchschnittliche Leukozytenzahl die sich aus beiden Parametern berechnen läßt, liegt bei ca. 3000 pro mm^3. Bei einem Gehalt von 0,2 ml Vollblut sind also ca. 6×10^5 Lymphozyten in jeder Kultur enthalten.

Das verwendete polyvalente Escherichia-Mischantigen (von F. Ørskovt, Kopenhagen) bestand aus abgetöteten Stämmen 01, 02, 04, 06, 07, 08, 018 und 075.

b) Autoradiographie

Zur besseren Absicherung des Ergebnisses zogen wir die Autoradiographie heran, wie sie LING (40) ebenfalls vorschlägt.

Die Stimulation der Lymphozyten mit E.-Coli-Mischantigen ist zu gering und deshalb mit dem Szintillations-Spektrometer nicht meßbar. Wir werteten diese Kulturen nur mit der Autoradiographie aus.

Abb. 5 zeigt den Ablauf bei der autoradiographischen Technik.

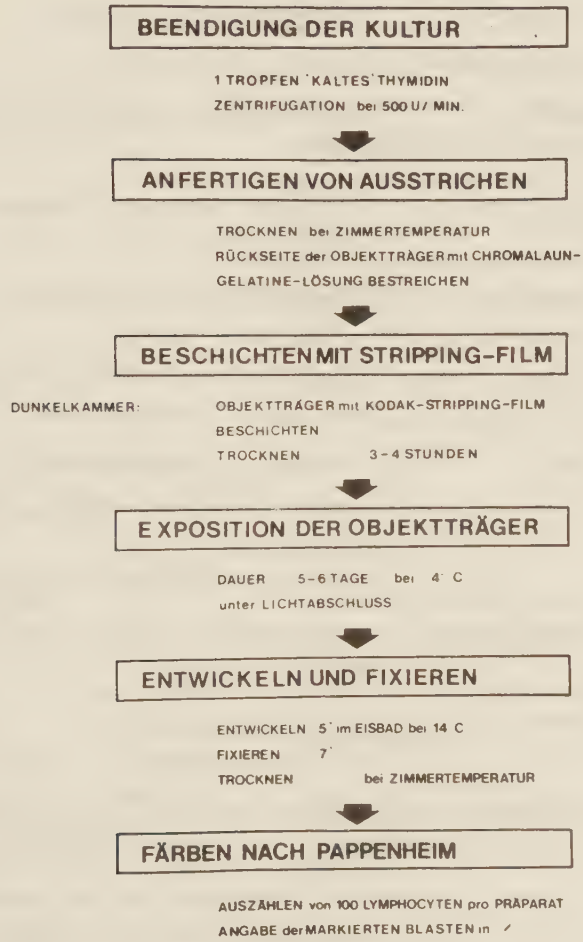


Abb. 5: Die Auswertung der Lymphozyten-Kulturen mit der autoradiographischen Technik modifiziert nach W. GEY (15).

III. Verwendetes Arbeitsmaterial

Heparin Liquemin^{R}	Hoffmann-La Roche, Grenzach
Dextran 6 % Makrodex^{R}	Knoll AG., Ludwigshafen
TC Medium 199	Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA
Antibiotic Mixture	Grand Island Biological Company, New York, USA
Phytohämagglutinin	PHA-P Difco, Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA PHA-P Wellcome Reagenr. Ltd., Kent, England, Lot K 2774 und 1596
H3-Thymidin	Thymidin-6-h3, Radiochemical Centre Amersham, Buckinghamshire, England Batch Nr. 136 Spezifische Aktivität 5,0 Curie/mmol
Szintillationsflüssigkeit	5,5 gr. Permablend (91 % PPO, 9 % MSB) in 1 l Toluol
Hyamine-Hydroxid 10x	Packard Frankfurt a.M. Catalog Nr. 6003005
E.Coli-Mischantigen	Dieses Antigen wurde aus den E.Coli-Stämmen 01, 02, 04, 06, 07, 08, 018 und 075 hergestellt und uns freundlicherweise von F. Ørskovt, Kopenhagen, zur Verfügung gestellt. Die Bakterienstämme wurden über Nacht kultiviert, am nächsten Tag in physiologischer Kochsalzlösung aufge-

	schwemmt, eine Stunde zur Abtötung von Mikroorganismen bei 100 ^{o} C gekocht und 40 Minuten lang bei 4000 rpm zentrifugiert. Nach dreimaligem Waschen wurde die Suspension in einem Spektralphotometer (Colemann Junior-Modell Junior 6/20) auf eine optische Dichte von 0,06 bei einer Wellenlänge von 650 nm eingestellt und dann gegen definierte Antiseren in verschiedenen Verdünnungen getestet. Die Verdünnung, mit der sich der höchste Titer ergab, wurde zu unseren Untersuchungen verwendet.
Filteranlage	Sartorius Vakuumanlage, Fa. Sartorius, Göttingen
Filter	Sartorius Glasfiberfilter Nr. 13400 Fa. Sartorius, Göttingen
Scintillations-counter	Packard Tri-carb Scintillationscounter
Stripping-Film	Kodak, Stuttgart
Essigsäure und Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt

E. ERGEBNISSE

I. Klinische Fälle

Im folgenden sind die Ergebnisse zusammengefaßt. Die Tabellen I, II a und b enthalten die Ergebnisse der Kinder mit gesicherten oder vermuteten Immundefekten.

In der Gruppe der Kinder mit gesicherten Immundefekten (s. Tab. I) waren folgende Ergebnisse bemerkenswert:

Beim Patienten Nr. 3, einem Fall einer schweren kombinierten Immundefizienz vom Schweizer Typ, erhielten wir bei der Lymphozyten-Stimulation mit PHA erwartungsgemäß eine Stimulationsrate, die nahezu dem Kontrollwert ohne Antigen-Zusatz entsprach. Gestützt wurde dieses Ergebnis durch eine Auswertung mit der Autoradiographie: Im Ausstrich der PHA-Kultur fand sich bei einer Auszählung von 100 Zellen nur ein radioaktiv markierter Lymphoblast, während in dem Ausstrich der Kontrollkultur keine Zelle markiert war.

In einem Fall einer chronischen myeloischen Leukämie (Pat. Nr. 2, Tabelle I) lag das Ergebnis der PHA-Stimulation im Normbereich. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Ergebnissen, die SCHREK und RABINOWITZ (67) 1963 bei der Lymphozyten-Stimulation von Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie erhielten.

Tabelle Nr. I: Pädiatrische klinische Fälle

Immundefizienzen und Leukämien, untersucht mit der Mikromethode (33)

Patient	Diagnose	Ergebnisse in cpm		
		Kontrolle	PHA	Index
Nr. 1 1 J.	akute lymphatische Leukämie (23 700 Leukozyten)	634	31 835	50
Nr. 2 3 J.	Chron. myeloische Leukämie (26 500 Leukozyten)	-	14 140	-
Nr. 3 3 J.	Schwere kombinierte Immun- defizienz vom Schweizer Typ	432	328	-
	Autoradiographie	0 %	1 % markierte Lymphoblasten	
	Postmortale Blutentnahme	510	786	1,5
Nr. 4 9 1/2 J.	rezidivierende Infekte, multiple Abzesse, Pyodermien. Staphylokokken-Abtötungsdefekt	131	38 070	290

Tabelle II a zeigt mit der Mikromethode (33) und Makromethode (70) untersuchte klinische Fälle, bei denen ein Defekt der zellvermittelten Immunität vermutet wird.

Bei der Patientin Nr. 1, einem ca. 5-jährigen Mädchen mit einer mucocutanen Candidose, war ebenfalls mit PHA keine Stimulation zu erreichen, die wesentlich über den Kontrollwerten lag. Bei dieser Patientin versuchten wir auch, mit einem Candida-Mischantigen eine Stimulation der kleinen Lymphozyten in vitro hervorzurufen. Das Ergebnis unterschied sich nicht wesentlich vom Kontrollwert, auch nach 8 Tagen hatte sich die Stimulationsrate gegenüber der Kontrolle nicht verändert. Nur bei diesem Patienten können wir einen Zusammenhang zwischen der herabgesetzten Reaktionsfähigkeit der kleinen Lymphozyten und dem Auftreten von Candida-Infektionen vermuten.

Bei allen anderen Patienten mit mucocutaner Candidose konnte mit PHA eine Stimulationsrate der kleinen Lymphozyten beobachtet werden, die sich nicht von der gesunder Kontrollpersonen unterschied.

Bei schweren Immundefekten wie z. B. bei der familiären septischen Granulomatose ist eine mucocutane Candidose wie bei unserem Patienten Nr. 5 vorhanden (s. auch HIGGS und WELLS,23). Interessant ist bei uns die fehlende Stimulation mit Candida-Mischantigen, also mit dem spezifischen Antigen. Das beweist, daß gegenüber Candida albicans noch keine Sensibilisierung erfolgt ist, bzw. zeigt einen Defekt der zellvermittelten Immunität gegenüber Candida an. Mit PHA wurde dagegen eine Stimulation erreicht, die der gesunder Kontrollpersonen entsprach.

Tabelle Nr. II: Pädiatrische klinische Fälle, untersucht mit der Mikromethode (33) und Makromethode (70). Erkrankungen, bei denen ein Defekt der zellvermittelten Immunität vermutet wird.

a) mucocutane Candidosen Mi = Mikromethode, Ma = Makromethode

Patient Nr., Alter	Diagnose	Ergebnisse in cpm Kontrolle	PHA	Index	Candida-Mischantigen (Bencard) 0,02	0,05	0,1 ml	Methode
Nr. 1 4 J.	mucocutane Candidose	58	95	-	33	33	32	Ma
Nr. 1	2. Kultur 8 Tage danach	285	-	-	-	185	135	Ma
Nr. 2 4 J.	Kontrollperson zu Nr. 1 (Minderwuchs)	128	-	-	150	126	41	Ma
Nr. 3 7 J.	Gesunde Kontrollperson zu Nr. 1	92	15 465	166	122	1786	539	Ma
Nr. 4 1/2 J.	mucocutane Candidose	672	51 940	77				Mi
Nr. 5 5 1/2 J.	Chron. Candidose septische Granulomatose	493	25 670	53				Mi

Der chronischen mucocutanen Candidose liegen verschiedene Immundefekte zugrunde, jedoch ist regelmäßig die zellvermittelte Immunität betroffen (66).

Die Patienten Nr. 5 und 1 (letzterer mit fehlender Stimulation auf PHA) unterstützen diese Beobachtung.

Die Tabelle II b zeigt das Ergebnis der Lymphozyten-Stimulation bei Sepsisfällen und anderen akuten und chronischen Infektionen. Bei diesen Erkrankungen sollte als Ursache ein Defekt der zellvermittelten Immunität ausgeschlossen werden.

In einigen Sepsisfällen, in einem Fall einer ausgedehnten Pyodermie und bei einem Patienten mit rezidivierenden respiratorischen Infekten sprachen die Ergebnisse der Lymphozyten-Stimulation mit PHA gegen einen Defekt der zellvermittelten Immunität.

Bei einem Fall einer Sepsis mit unbekanntem Erreger (Patient Nr. 3), der ungezielt mit Antibiotika (Gentamycin ^{R} und Anabactyl ^{R}) behandelt wurde, konnte mit einem E.-Coli-Mischantigen eine Stimulationsrate erzielt werden, die etwa 25mal so hoch lag wie die Stimulationsrate ohne Antigenzusatz. Dieses Ergebnis zeigt eine bereits gegenüber E. coli erfolgte Sensibilisierung dieses Patienten.

Eine niedrige Stimulationsrate mit PHA fand sich bei der Patientin Nr. 5, einem 8 Tage alten Mädchen, das in der Folge an einer Sepsis mit Candida albicans und Escherichia coli starb. Auffällig war bei dieser Patientin eine Lymphopenie von 1800 pro mm^3 bei einer relativen Lymphozytose von 82 %. Aus diesem Ergebnis läßt sich zunächst nur die Folgerung ziehen, daß man bei Sepsisfällen

auch an einen Defekt der zellvermittelten Immunität denken sollte. Dieses Ergebnis stützt die Beobachtung von COOPER et al. (7), daß die T-Lymphozyten Zellreaktionen vermitteln, die wichtig für die Abwehr von Pilzinfektionen sind.

Unsere Untersuchungen zeigen, daß in allen Fällen, in denen auf Grund von chronischen und schweren Infektionen und von pathologischen Werten des weißen Blutbildes an einen Defekt der zellvermittelten Immunität gedacht werden muß, der Lymphozyten-Transformations-Test ein brauchbarer Test ist, um solche Defekte auszuschließen. Allerdings lassen sich die Störungen der Lymphozytenfunktion nur grob erfassen und nur an Hand der Transformierbarkeit mit PHA oder mit spezifischen Antigenen. Die Kultivierung mit spezifischem Antigenzusatz ist nur sinnvoll, wenn man wie bei unserer Makromethode größere Blut- und damit auch Lymphozytenmengen zur Verfügung hat.

Die Stimulationsrate beim Patienten Nr. 6, einem 14 Tage alten Frühgeborenen, zeigt, daß bei der Geburt bereits immunkompetente Zellen vorhanden sind.

Tabelle Nr. II b) Sepsisfälle und andere akute und chronische Infektionen

Mi = Mikromethode Ma = Makromethode

Patient	Diagnose	Ergebnisse in cpm Kontrolle	PHA	Index				Methode
Nr. 1 1 1/2 J.	Verd. auf Sepsis	216	26 410	122				Mi
Nr. 2 8 J.	Staphylokokken-Osteomyelitis u. -sepsis	174	14 700	85				Mi
Nr. 3 5 J.	Sepsis (unter Antibiotikabehandlung)	296	4 460	15				
	nach Behandlung	146	25 570	175	E. Coli-Mischantigen 0,02 1980	0,05 3600	0,1 ml 3300	Ma
Nr. 4 14 Tage	Frühgeborenes (Verd. auf Sepsis	238	49 266	207				Ma
	Nach Transfusion von 10 ml Frischblut (3320 Lymphoz./mm^3)	324	22 603	70				Ma
Nr. 5 8 Tage	Candida-albicans- u. E.-Coli-Sepsis (Blut 24 h unverarbeitet im Brutschrank). Zust. nach OP einer Gastroschisis	115	188	1,6				Mi
Nr. 6	Frühgeburt (vor Austauschtransfusion)	312	9 740	31				Mi

Tabelle Nr. II b), Forts.

Patient	Diagnose	Ergebnisse in cpm Kontrolle	PHA	Index	Methode
Nr. 7 5 J.	Chron. Enteritiden und Bronchitiden (familiär) Antikörpermangelsyndrom	68	32 370	550	Mi
Nr. 8 8 J.	Bronchiektasien, rezidivierende pulmonale Infekte, Down-Syndrom	306	37 225	120	Mi
Nr. 9 8 J.	Osteomyelitis u. Phlegmone beider Unterschenkel	249	16 980	68	Mi
Nr. 10 7 J.	Sinus-Histiozytose (Restblut nach Abtrennen des leukozytenreichen Überstandes nach einer Stunde	0,4 ml Blut pro Kultur 306	1 970	32	Mi

II. Operative Fälle

In Tabelle Nr. III sind die Ergebnisse aller operierten Kinder vor und nach Operationen im Alter von 1 Tag bis zu 11 Jahren aufgeführt. Die Auswertung erfolgte mit einem Liquid-Szintillations-Zähler.

Bei den Neugeborenen (Patient Nr. 1 - 5) betrug die Operationsdauer zwischen 45 und 105 Minuten. Von 6 Patienten wurden vor und nach der Operation Lymphozyten-Kulturen angelegt. 5 Fälle konnten ausgewertet werden. In jeweils 4 Fällen wurden Bluttransfusionen und Antibiotika gegeben. Die applizierten Antibiotika waren: Refobacin ^{R}, Anabactyl ^{R}, Cephalotin ^{R}, Paraxin ^{R}, Baycillin ^{R}, Totocillin ^{R}. Ein 6 Tage altes Neugeborenes verstarb nach einer 135 Minuten dauernden Ileumresektion und darauf folgender Peritonitis.

In 5 von 6 Fällen war der 1. postoperative Stimulationswert (ausgedrückt in cpm) niedriger als der präoperative. Die erste Blutentnahme erfolgte 1 1/2 bis 3 Stunden nach der Operation.

Auffällig in der Gruppe der Neugeborenen war zunächst die geringe Stimulierbarkeit der kleinen Lymphozyten vor der Operation. Bei 3 Patienten lag sie unter 3000 cpm, in einem Fall bei 5000 cpm und in einem bei ca. 10000 cpm. Nur bei einem Patienten betrug die Stimulationsrate über 20000 cpm und lag damit in einem Bereich, den wir bei älteren Kindern fanden. Gerade bei diesem Patienten, einem 6 Tage alten Neugeborenen mit einer Duodenalstenose und einer Malrotation, bei dem eine Dünndarmresektion durchgeführt wurde, war der erste postoperative Stimulationswert besonders niedrig. Er betrug nur 7,3 % des Ausgangs-

wertes, nach 3 Tagen 5 % und nach insgesamt 7 Tagen 14,2 % (Pat. Nr. 3).

Patient Nr. 2 zeigte nach 1 1/2 Stunden, 3 und 7 Tagen nach der Operation eine über 100 % ansteigende Stimulationsrate, die nach 7 Tagen 145 % des präoperativen Wertes betrug. Die bei dem 2 Tage alten Neugeborenen durchgeführte Herniotomie (bei einer ausgedehnten Hiatushernie) dauerte 80 Minuten. Nach 6 Tagen fand sich im Pleurapunktat Pseudomonas aeruginosa, im bei einer Bronchoskopie gewonnenen Brochialsekret Streptococcen der Gruppe D und im Herzbeutelpunktat am 12. postoperativen Tag kurz vor dem Exitus Klebsiellen. Ob die erhöhte Stimulationsrate durch die intraoperative Bluttransfusion bedingt ist, muß offen bleiben. Auffällig ist, daß der präoperative Wert mit 2348 cpm relativ niedrig liegt.

Die Lymphozyten-Kulturen der Neugeborenen wurden nur mit dem Liquid-Szintillations-Zähler und nicht mit der Autoradiographie ausgewertet.

Ebenfalls in der Tabelle Nr. III sind die Ergebnisse der Säuglinge aufgeführt (Pat. Nr. 6 - 12). 6 Patienten im Alter von 2 bis 12 Monaten konnten untersucht und ausgewertet werden. Die Operationsdauer war mit 20 bis 180 Minuten unterschiedlich.

Die postoperative Stimulationsrate war bei allen Patienten verglichen mit dem präoperativen Wert erniedrigt. Interessanterweise war diese bei den beiden Patienten (Nr. 8 und 12) mit der längsten Operationsdauer am niedrigsten: 11,3 bzw. 15 % 4 Stunden nach der Operation. Abb. Nr. 6 zeigt den postoperativen Verlauf der Stimulationsrate auch nach der 2. Operation, die wegen eines Platzbauches notwendig war.

Abb. Nr. 7 zeigt das Verhalten der Stimulationsrate eines zweimonatigen Säuglings (Pat. Nr. 12) nach einer Portoenterostomie bei einer Gallengangsatresie. Der Säugling erhielt während der dreistündigen Operation 50 ml Blut und während der folgenden Tage Anabactyl ^{R}, Refobacin ^{R}, Binotal ^{R} und Decortin ^{R}. Trotz der erheblichen Lymphozytose blieben die postoperativen Werte am 7. und 10. Tag bei 6,3 bzw. 5,3 %.

Trotz der auf längere Sicht infausten Prognose (Gallengangsatresie, Portoenterostomie nach Kasai), trotz der 3 Stunden langen Operation und der danach langandauernden Herabsetzung der Lymphozytenstimulation konnten wir einen bei diesem schweren Krankheitsbild relativ komplikationslosen Heilungsverlauf beobachten.

Beim Patienten Nr. 8 (Abb. Nr. 6) dagegen wurde nach 8 Tagen fast der doppelte Wert des präoperativen Ausgangswertes erreicht und nach insgesamt 11 Tagen praktisch der präoperative Ausgangswert. Eine Korrelation zum klinischen Bild ergab sich nicht. Der Patient Nr. 8 verstarb ca. 6 Wochen nach der Operation am Rechtsherzversagen. Bei ihm lagen verschiedene Mißbildungen vor:

Ureterabgangsstenosen mit Hydronephrosen und ein Herzvitium (Verdacht auf Vorhofseptum- oder Ventrikelseptum-Defekt). Am 8. postoperativen Tag infizierte sich die Operationswunde trotz der Gabe von Antibiotika mit Escherichia coli. An diesem Tage wurde wegen eines Platzbauches relaparatomiert, anschließend traten mehrere Nachblutungen auf. 5 Tage vor dem Exitus wurde noch eine Pneumonie diagnostiziert.

Tabelle Nr. III: Die ^{3}H-Thymidin-Aufnahme der Lymphozyten von operierten Kindern in cpm (präoperativ) und postoperativ in % der präoperativen Werte

Pat.	Alt.	Diagnose bzw. Operation	OP-D. Min.	präop. cpm	postop. Std.	postop. Werte in % des präop. nach Tagen 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1 T.	Meningo-myelozele	105	2227	3	76,4		72,7			200		nach 4 Wochen: 91,7 %		
2	2 T.	Zwerchfell-hernie, (verst.)	80	2348	1,5	133,1		142,8				145,3			
3	6 T.	Duodenalstenose, Malrotation	90	22783	2,5	7,3		5				14,2			
4	1 T.	Leistenhernie, Hodentorsion	45	2841	2	24		29,7				68,6			
5	9 T.	Hodentumor	45	5213	2	50		23,6							
6	4 Mo.	Spitz-Holter-Ventil	60	2065	6	42		318				82,5			
7	4 Mo.	Syndaktylie	45	12850			65,8								
8	1/2 J.	Ureterverlegung (verstorben)	140	26500	4	11,3			36,4				185		13 T. 104
9	1/2 J.	Analfistel	45	32490			24							140	
10	1 J.	Ventilentfernung b. Hydrocephalus	20	59000	1	69,5						131			13 T. 22,8
11	1 J.	Megacolon, Hemicolektomie		31205				153		51,3					70

Tabelle III, Forts.

Pat.	Alt.	Diagnose bzw. Operation	OP-D. Min.	präop. cpm	postop. Std.	postop. Werte in % des präop. nach Tagen 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
12	2 Mo.	Gallengangs-atresie	180	17735	4	15						6,3			5,3
13	9 J.	Refluxplastik	105	4400			91,5			480				17,5	
14	3 J.	Hämangiom	25	4560					182			63			216
15	6 J.	Doppelniere, Polresektion	90	12825	8	26,2				133			17,7		
16	6 J.	Leydig-Zell-Tumor	75	18500			73,4						172		
17	6 J.	Overialtumor	90	2623	8	47			60,3					186	
18	3 J.	Pyloroplastik	45	45140			27,5			109					132
19	7 J.	Megacolon	90	39500			7,2			57					147
20	7 J.	Megacolon	120	46030			5,8			96					86,5
21	8 J.	Ureterabgangs-stenose	105	36250			91,7			89					
22	9 J.	Ureterverleg.	105	41100	8	54,7			193,5					29	
23	11 J.	Schilddrüsen-adenom	80	34620			76			50,5					

Tabelle III, Forts.

Pat.	Alt.	Diagnose bzw. Operation	OP-D. Min.	präop. cpm	postop. Std.	postop. Werte in % des präop. nach Tagen 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
24	5 J.	Refluxplastik	80	16082				262							85
25	5 J.	Doppelniere, Polresektion	105	17235	8	12,9		117							
26	8 J.	Pneumonektomie	190	33230				19,3			74				11 T. 26
27	6 1/2 J.	Refluxplastik	25	24780				35							13

Pat. Nr. 1 - 5: Neugeborene

Pat. Nr. 6 - 12: Säuglinge

Pat. Nr. 13 - 27: Klein- und Schulkinder

Die Pat. Nr. 1, 2, 4, 11, 12 und 19 erhielten während der Operation Bluttransfusionen.

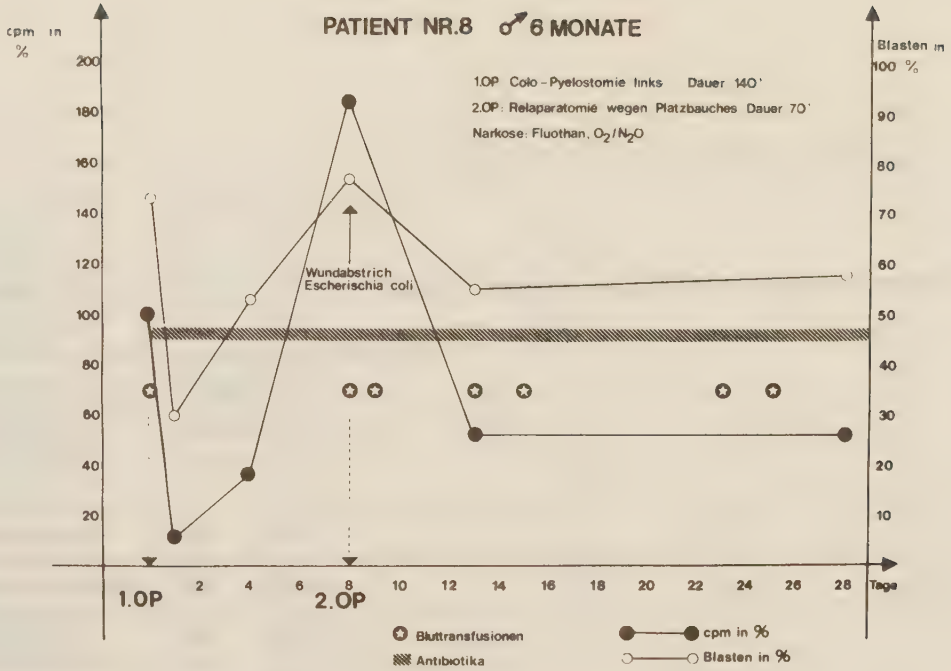


Abb. Nr. 6: Patient Nr. 8.

Die ^{3}H-Thymidin-Aufnahme der Lymphozyten vor und nach der Operation, gemessen in cpm. Der präoperative Wert wurde gleich 100 % gesetzt.
Kontrolle der Ergebnisse durch die Autoradiographie (Angabe der markierten Blasten pro 100 ausgezählte Lymphozyten).

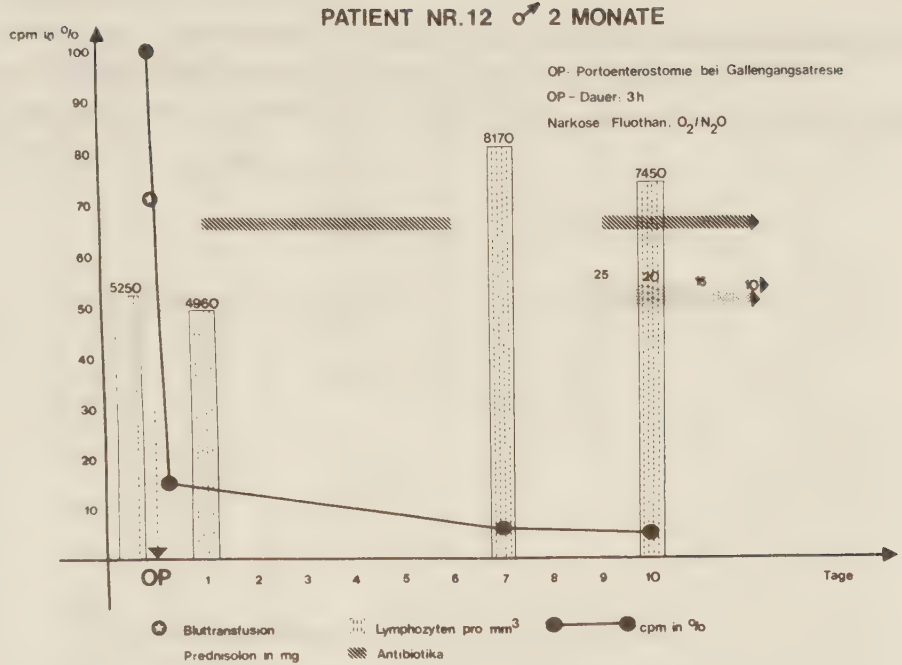


Abb. Nr. 7: Patient Nr. 12.

Die ^{3}H-Thymidin-Aufnahme der Lymphozyten vor und nach der Operation, gemessen in cpm. Der präoperative Wert wurde gleich 100 % gesetzt.

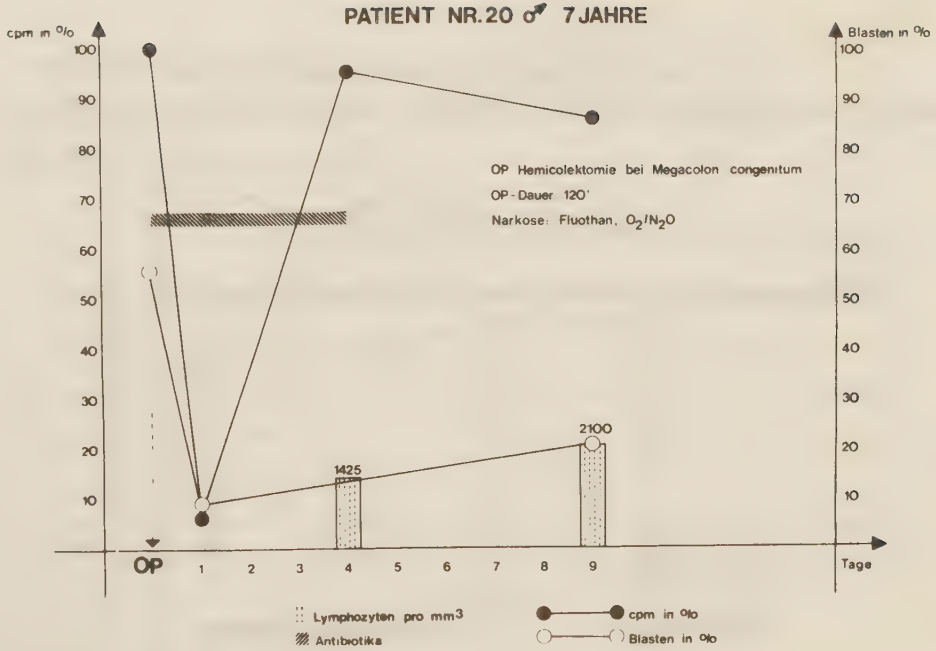


Abb. Nr. 8: Patient Nr. 20.

Die ^{3}H-Thymidin-Aufnahme der Lymphozyten vor und nach der Operation, gemessen in cpm. Der präoperative Wert wurde gleich 100 % gesetzt.
Kontrolle der Ergebnisse durch die Autoradiographie (Angabe der markierten Blasten pro ausgezählte Lymphozyten).

Beim Pat. Nr. 10 (Abb. Nr.10) wurde bei einem Hydrocephalus ein Spitz-Holter-Ventil bei einer 20-minütigen Narkose entfernt. Bis zum 6. postoperativen Tag war keine wesentliche Herabsetzung der Stimulationsrate zu beobachten. Erst am 13. Tag konnten wir mit 22,8 % einen niedrigen Wert beobachten.

Alle 15 ausgewerteten Klein- und Schulkinder (Pat. Nr. 13 - 27) konnten nach erfolgreichem postoperativem Heilungsverlauf entlassen werden. In allen 15 Fällen fanden wir, daß die auf PHA erfolgende Stimulation kleiner Lymphozyten postoperativ geringer war als vor der Operation. Am größten war dieser Rückgang bei zwei 7-jährigen Kindern, bei denen wegen eines Megacolons eine Hemi-Colektomie vorgenommen wurde (Pat. Nr. 19 und 20). Abbildung Nr. 9 und 10 zeigen den Verlauf der Lymphozyten-Stimulation. Die postoperative Stimulationsrate betrug 7,2 und 5,8 % des präoperativen Wertes. In diesen Fällen scheint möglicherweise die lange Operationsdauer und der relativ große Blutverlust in einem gewissen Zusammenhang mit der reduzierten Stimulationsrate zu stehen. Beim Patienten Nr. 16 (Tab. III) hatten wir ja eine ähnliche Beobachtung gemacht.

In 12 von 15 Fällen stellte sich heraus, daß 3 bis 9 Tage nach der Operation eine Stimulationsrate erreicht wurde, die die präoperative z. T. erheblich übertraf oder zumindest annähernd erreichte. Eine ähnliche Beobachtung konnte bei 6 unserer 7 untersuchten Säuglinge gemacht werden, während die Stimulationsrate der Neugeborenen unterschiedliche Ergebnisse in dieser Hinsicht aufwies.

Die Abbildungen 9 - 12 zeigen die Ergebnisse bei 4 Klein- und Schulkindern. 3 Patienten zeigen einen z. T. erheblichen Abfall der postoperativen Stimulationsrate, während 1 Patient postoperativ praktisch eine gleich hohe Stimulationsrate aufweist.

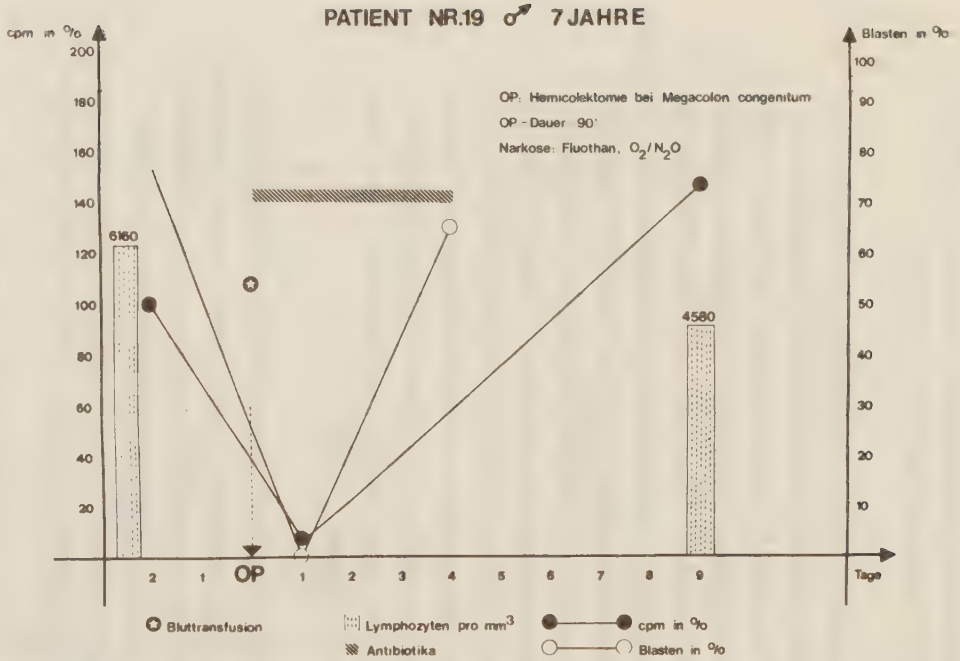


Abb. Nr. 9: Patient Nr. 19.

Die ^{3}H-Thymidin-Aufnahme der Lymphozyten vor und nach der Operation, gemessen in cpm. Der präoperative Wert wurde gleich 100 % gesetzt.
Kontrolle der Ergebnisse durch die Autoradiographie (Angabe der markierten Blasten pro 100 ausgezählte Lymphozyten).

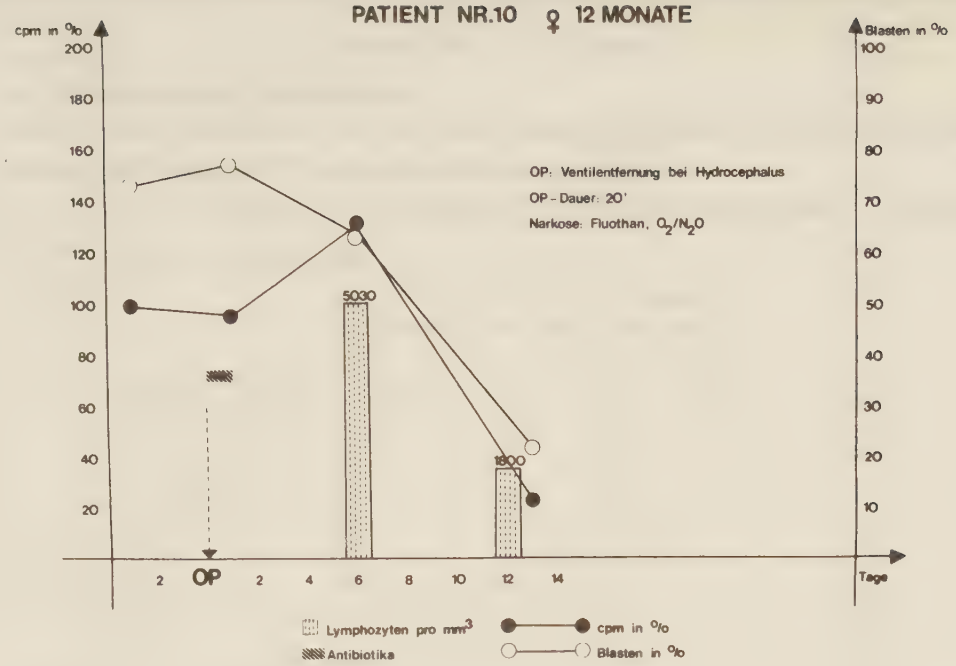


Abb. Nr. 10: Patient Nr. 10.

Die ^{3}H-Thymidin-Aufnahme der Lymphozyten vor und nach der Operation, gemessen in cpm. Der präoperative Wert wurde gleich 100 % gesetzt.
Kontrolle der Ergebnisse durch die Autoradiographie (Angabe der markierten Blasten pro ausgezählte Lymphozyten).

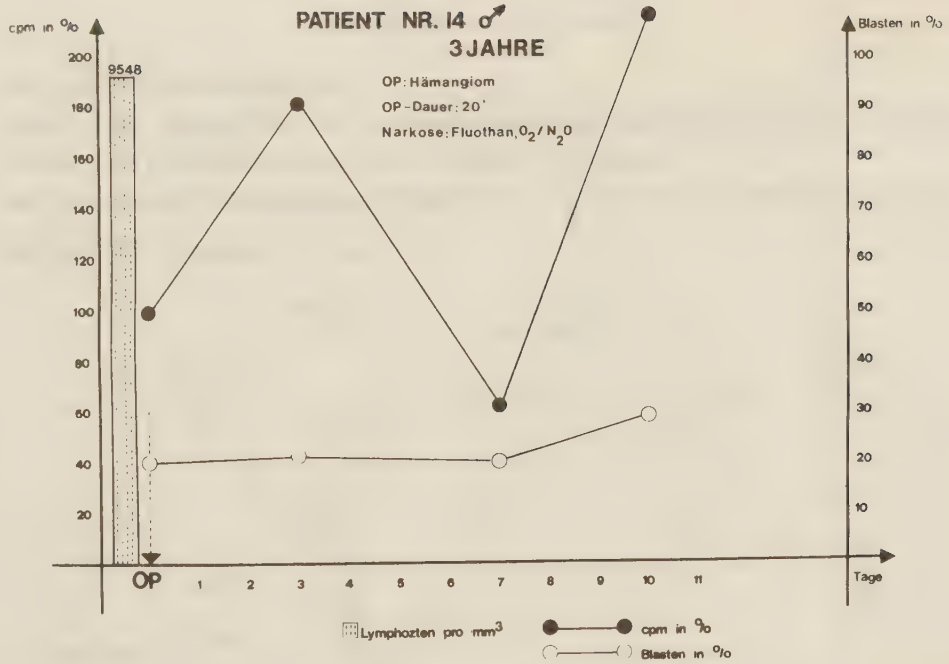


Abb. Nr. 11: Patient Nr. 14.

Die ^{3}H-Thymidin-Aufnahme der Lymphozyten vor und nach der Operation, gemessen in cpm. Der präoperative Wert wurde gleich 100 % gesetzt.
Kontrolle der Ergebnisse durch die Autoradiographie (Angabe der markierten Blasten pro 100 ausgezählte Lymphozyten).

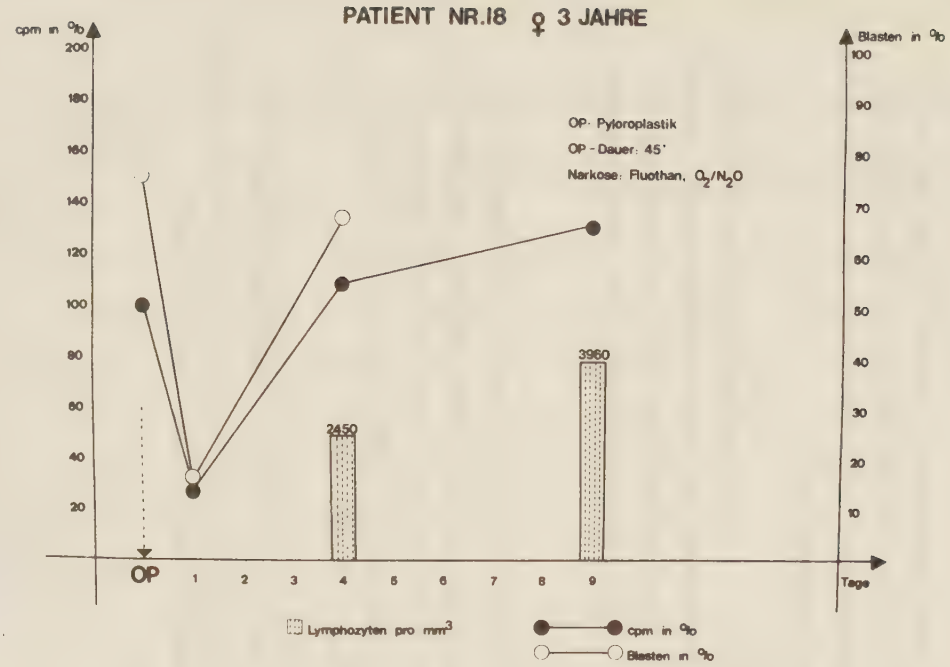


Abb. Nr. 12: Patient Nr. 18.

Die ^{3}H-Thymidin-Aufnahme der Lymphozyten vor und nach der Operation, gemessen in cpm. Der präoperative Wert wurde gleich 100 % gesetzt.
Kontrolle der Ergebnisse durch die Autoradiographie (Angabe der markierten Blasten pro 100 ausgezählte Lymphozyten).

Bei 21 Patienten wurden die mit dem Liquid-Szintillations-Zähler ermittelten Ergebnisse mit der Autoradiographie überprüft. Diese Ergebnisse sind in der Tabelle Nr. IV aufgeführt.

Mit Ausnahme des Patienten Nr. 18 zeigte sich, daß bei allen Patienten unsere wichtigste Beobachtung, daß die Stimulierbarkeit kleiner Lymphozyten nach Operationen herabgesetzt ist, durch die zweite Methode gestützt wurde.

Beim Patienten Nr. 10 wurden im autoradiographischen Präparat postoperativ etwa ebenso viele Lymphoblasten ausgezählt wie präoperativ. Das mit dem Szintillations-Zähler erhaltene Ergebnis von 69,5 % liegt allerdings nicht erheblich unter dem präoperativen Wert.

Das interessanteste Ergebnis war, daß beim Patienten Nr. 19 nach der Operation im Ausstrich kein Lymphoblast markiert war, während vor der Operation 68 % markierte Lymphoblasten gezählt wurden. Hier fiel das Ergebnis also noch deutlicher aus, als wir es in cpm gemessen hatten.

Die Auswertung der autoradiographischen Präparate ergab also in keinem Fall eine erhebliche Abweichung von den Ergebnissen, die mit dem Liquid-Szintillations-Zähler erzielt wurden.

Tabelle Nr. IV: Die ^{3}H-Thymidin-Aufnahme der Lymphozyten von operierten Kindern in % markierter Blasten (Präoperativ = 100)

Pat.	Alt.	Diagnose bzw. Operation	OP-D. Min.	präop. %	postop. Std.	postop. Werte in % des präop. nach Tagen									
						1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
6	4 Mo.	Spitz-Holter-Ventil	60	100	6	52,5		105			100	87		145	
7	4 Mo.	Syndaktylie	45	100		65									-
8	1/2 J.	Ureterverlegung	140	100	4	46			74				106		
9	1/2 J.	Analfistel	45	100		60			56,5					-	
10	1 J.	Ventilentfernung b. Hydrocephalus	20	100		105						95			
11	1 J.	Megacolon, Hemicolektomie	105	100			149			-					21
12	2 Mo.	Gallengangsatresie	180	100	4	20						9			8
13	9 J.	Refluxplastik	105	100		95			124				26		
14	7 Mo.	Hämangiom	25	100				105			100			145	
15	6 J.	Doppelniere, Polresektion	90	100	8	39			93			-			
16	6 J.	Leydig-Zell-Tumor	75	100		91						103			

Tabelle Nr. IV, Forts.

Pat.	Alt.	Diagnose bzw. Operation	OP-D. Min.	präop. %	postop. Std.	postop.	Werte in % des präop. nach Tagen 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
17	6 J.	Overialtumor	90	100	8	48			-					-		
18	3 J.	Pyloroplastik	45	100			20			89					-	
19	7 J.	Megacolon	90	100			0 !			83					-	
20	7 J.	Megacolon	120	100			16			-					38	
21	8 J.	Ureterabgangs-stenose	105	100			18			-						
22	9 J.	Ureterverlegung	105	100	8	88			106					-		
23	11 J.	Schilddrüsen-adenom	80	100			78			-						
24	5 J.	Refluxplastik	80				95		190	124				26		105
25	5 J.	Doppelniere, Polresektion	105		8	26			-							
26	8 J.	Pneumonektomie	190						50			95				-
27	6 1/2 J.	Refluxplastik	25						49							41

Pat. Nr. 6 - 12 u. 14: Säuglinge, Pat. Nr. 13, 15 - 27: Klein- und Schulkinder

F. DISKUSSION

RIDDLE und BERENBAUM (58) untersuchten 5 Patienten im Alter von 57 - 72 Jahren vor und nach Operationen im Hinblick auf die Lymphozyten-Transformation auf PHA. Die Operationsdauer betrug zwischen 20 Minuten und 4 Stunden. In allen Fällen war nach der Operation eine geringere Transformation zu beobachten als vor der Operation, davon bei 2 Patienten in weniger als 24 Stunden und bei 2 weiteren in 5 - 8 Tagen. Von den 5 Patienten erhielten 3 während der Operation Bluttransfusionen. Das Absinken der Transformationsrate blieb davon unbeeinflußt, es ist nach Meinung der Autoren also keine Reaktion auf die Bluttransfusion, da es Patienten mit und ohne Transfusion gleichermaßen betrifft.

Die Lymphozyten-Depression, so die Untersucher, wird möglicherweise durch Substanzen vermittelt, die vom verletzten Gewebe stammen oder durch Steroide, die durch die Nebennieren als Antwort auf den Operationsstress freigesetzt werden.

RIDDLE und BERENBAUM weisen darauf hin, daß der Zusammenhang zwischen der Immunkompetenz der kleinen Lymphozyten und der Transformierbarkeit nach wie vor unsicher ist.

Zu den genannten Untersuchungen ist Kritik angebracht. Bei nur 5 Patienten mit Operationen von unterschiedlicher Dauer und Schwere können kaum statistisch signifikante Aussagen gemacht werden. Gerade weil die Autoren als mögliche Erklärung für die Lymphozyten-Depression den Operationsstress genannt haben, wäre eine Gegenüberstellung von Patienten mit kurzer und langer Operationsdauer sinnvoll gewesen. Als Anästhetika wurden Lachgas, Thiopental und Suxamethonium verwendet, denen kein Ein-

fluß auf die Depression zugeschrieben wurde, da die Lymphozytentransformation nach der Operation bei einer Operationsdauer von 20 Minuten bis 4 Stunden kein unterschiedliches Verhalten zeigte.

Bei PARK et al. (54) wurden 21 Patienten im Alter von 24 - 76 Jahren mit einer Operationsdauer von 1 1/2 bis 6 1/2 Stunden im Hinblick auf die Lymphozyten-Transformation mit PHA untersucht. In Gruppe 1 mit 10 Patienten wurden die Lymphozyten mit autologem Plasma angesetzt. In einer 2. Gruppe wurde das Plasma von 6 Patienten mit Lymphozyten gesunder Versuchspersonen inkubiert, um den Einfluß humoraler Faktoren auf die Lymphozyten zu studieren. In einer 3. Gruppe wurden die Lymphozyten operierter Patienten mit dem Plasma gesunder Versuchspersonen inkubiert.

Das Ergebnis war, daß bei allen Patienten, insbesondere bei Herzoperationen und Krebspatienten, der postoperative Einbau von ^{3}H-Thymidin in die Lymphozyten, gemessen mit einem Packard-Liquid-Szintillations-Zähler, innerhalb der ersten 2 Stunden geringer war als vor der Operation. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit unseren Beobachtungen bei operierten Kindern, obwohl wir weder Patienten mit Herzoperationen oder Malignomen hatten.

Innerhalb einer Woche stiegen die Stimulationswerte mit Ausnahme eines Krebspatienten auf über 100 % an. Das Verhalten der ^{14}C-Thymidin-Inkorporation in Lymphozyten gesunder Personen (mit Patientenplasma inkubiert) war ähnlich wie in der ersten Patientengruppe. Ebenso verlief die Lymphozyten-Transformation in der Gruppe 3.

Die Autoren zogen die Folgerung, daß die geringe postoperative Transformierbarkeit kleiner Lymphozyten ihren Grund haben

könnte in den Narkotika, da die Patientengruppen 1 (mit autologem Plasma) und 3 (mit Lymphozyten von Patienten mit normalem Plasma) gleichermaßen betroffen sind.

Das zweite wichtige Ergebnis sehen die Autoren darin, daß die Art der Erkrankung einen Einfluß auf die präoperative Lymphozytenantwort auf PHA und das Ausmaß und die Dauer des Defektes der postoperativen DNA-Synthese hat. Als Erklärung für die niedrigen präoperativen Werte, die bei Herzoperationen gesehen werden, sehen die Autoren einen bei diesen Erkrankungen häufigen Folsäuremangel an. Folsäure wirkt bei der Methylierung von Thymidin mit. Ein Mangel führt zu einer verminderten DNA-Synthese.

In dieser Arbeit wird der Einfluß von Bluttransfusionen, die 12 von 21 Patienten erhielten, nicht diskutiert. Angeblich erhielten die Patienten vor, während und nach der Operation keine Immunsuppressiva.

SLADE et al. berichteten 1975 ebenfalls über eine Immunsuppression bei 12 gesunden Nierenspendern nach der Nephrektomie (62). Während der Operation und bis zum Abend danach waren folgende Parameter bzw. Funktionen herabgesetzt: Blutlymphozyten (gesamt), B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, mitogene Blastenantwort (auch auf PHA) und die gemischte Lymphozyten-Reaktion. Der Grad der Immundepression und der folgenden Normalisierung war individuell verschieden, jedoch waren die Werte am 5. postoperativen Tag nahezu normal. Wir sind in der Gruppe der Säuglinge und älteren Kinder zu ähnlichen Ergebnissen gekommen. Interessanterweise waren bei den genannten Autoren die Immunglobuline postoperativ nicht vermindert.

In einer weiteren Arbeit von TIN HAN (74) wurde die Reaktion der Lymphozyten von 6 Patienten mit Brustkrebs vor und nach radikaler oder einfacher Mastektomie auf PHA und andere spezifische und unspezifische stimulierende Agentien untersucht. Die Antwort auf PHA gemessen an der Einbaurate von ^{3}H-Thymidin in die Lymphozyten-DNA, war bei allen Patienten auf Werte von 10 - 43 % des präoperativen Wertes reduziert. Die Operationsdauer betrug 2 1/4 bis 4 3/4 Stunden. Der Autor verwendete wie wir Lymphozytenkulturen mit Vollblut.

Es gibt zahlreiche Faktoren, die die PHA-Stimulation kleiner Lymphozyten bei operierten Patienten beeinflussen können.

SCHECHTER et al. (63) untersuchten den Einfluß von Bluttransfusionen auf die PHA-Stimulation kleiner Lymphozyten von 17 chirurgischen und internistischen Patienten. Bei 15 dieser Patienten beobachteten sie eine fünffache oder größere Inkorporation von ^{3}H-Thymidin und eine Vermehrung von atypischen Lymphozyten (gemeint sind Lymphoblasten) um das fünf- oder mehrfache als vor den Transfusionen. Ebenso war das Verhalten der Lymphozyten-Transformation bei der Transfusion von gefrorenen Erythrozyten, das heißt es fehlten hier Leukozyten, Thrombozyten und Plasma.

Nach Meinung der Autoren ist möglicherweise bei den chirurgischen Patienten durch den Operationsstress ein Einfluß auf die Lymphozytenantwort gegeben, der vielleicht mit der sofort nach der Operation beobachteten Lymphopenie in Verbindung steht.

Im Gegensatz dazu stehen unsere Beobachtungen, da wir nach den Operationen weder eine deutliche Lymphopenie sahen, noch eine

eindeutige lineare Korrelation zwischen der Lymphozytenzahl und der in cpm gemessenen Stimulierungsrate. Die von den zitierten Autoren und von uns gefundene erniedrigte Stimulationsrate nach Operationen ist nach unserer Meinung keine Folge der Lymphopenie, sondern durch eine qualitative Veränderung der kleinen Lymphozyten erklärbar.

Allerdings war die Operationsdauer unserer Patienten zum größtenteil wesentlich kürzer als bei den Patienten mit Herzoperationen von PARK et al. (54).

Trotzdem zeigen die Patienten von SCHECHTER et al. mit Transfusionen signifikant höhere ^{3}H-Thymidin Inkorporationsraten als die chirurgischen Patienten ohne Transfusionen. Die Patienten ohne chirurgische Eingriffe mit Transfusionen zeigten einen ähnlich erhöhten ^{3}H-Thymidin-Einbau eine Woche später und einen Anstieg von atypischen Lymphozyten. Diese Ergebnisse werden von den Autoren als eine immunologische Antwort auf die Transfusion von Leukozyten angesehen, die in den üblichen Blutkonserven enthalten sind. Es handelt sich hier praktisch um eine gemischte Leukozyten-Reaktion.

Von allen Autoren wird der Operationsstress als Erklärung für die postoperative Lymphozyten-Depression herangezogen. Es erscheint deshalb sinnvoll die Bedeutung des Cortisols, Hydrocortisons und Prednisolons auf die Lymphozyten-Transformation zu untersuchen.

Es ist bekannt, daß während einer Äthernarkose die Corticoid-Konzentration im peripheren Venenblut signifikant erhöht ist (VANDAM und MOORE, 77). Bei der zitierten Arbeit wird von

einer 22-jährigen, freiwilligen Versuchsperson berichtet, die einer Pentothal-Äther-Narkose unterzogen wurde. Bei dieser Versuchsperson ist die Narkose ein starkes, aber vorübergehendes Stimulus für eine erhöhte Sekretion von Corticosteroiden. Das Maximum des Corticoidspiegels ist etwa 4 Stunden nach der Narkose erreicht und beträgt ca. das Vierfache des Wertes vor der Narkose. Über die Wirkung des von uns als Narkotikum verwendeten Fluothans (in Verbindung mit Lachgas und O_2) auf die Immunantwort des Menschen ist wenig bekannt. HUMPHREY et al. (27) berichten von einer Reduktion der weißen Blutzellen und der Immunglobuline im peripheren Blut nach einer 1-stündigen Fluothan-Narkose.

Wünschenswert wäre das am wenigsten Stress erzeugende Narkotikum, auch wenn die Narkose so kurz wie möglich dauern würde. Eine lokale oder spinale Anästhesie und Barbiturate erfüllen dieses Ziel. Ebenso blockieren Hypothermietechniken bei der Anästhesie die Antwort der Nebenniere auf Stress mit dem zusätzlichen Vorteil einer verminderten metabolischen Aktivität. BERNHARD und SWAN (zitiert nach 77) fanden unter der Hypothermie keine weitere Veränderung des Serumspiegels von 17 Hydroxy-Corticoiden während Operationen bei Mensch und Hund. Es bleibt eine ausreichende Basiskonzentration von Corticoiden, die für die Homöostase während der Operation notwendig ist.

FISCHER (13) hat den Plasma-Cortisol-Spiegel bei operierten Erwachsenen, Kindern und Neugeborenen vor, während und nach dem Operationsstress untersucht. Es zeigten sich folgende Ergebnisse:

Bei Kindern fand sich eine signifikante Plasma-Cortisol-Erhöhung, die die der Erwachsenen noch übertraf. Interessant war das Ver-

halten des Spiegels bei Neugeborenen. Hier wurde keine sichere Erhöhung unter dem Operationsstress beobachtet. Ergänzt wurden diese Ergebnisse durch tierexperimentelle Untersuchungen von HOLLMANN (26) in Hinblick auf das Verhalten im hämorrhagischen Schock. Die Toleranz der Hundesäuglinge gegenüber dem Schock durch Blutentzug ist gegenüber erwachsenen Hunden schlechter, die Oligämie und Überlebenszeit sind signifikant kürzer. Die Dekompensation des Säure-Basen-Haushaltes als Folge einer metabolischen Azidose erfolgt beim Hundesäugling schneller und stärker als beim ausgewachsenen Tier. Bei Übertragung dieser Verhältnisse auf den menschlichen Säugling ergeben sich bei Operationen mit großem Blutverlust gegenüber dem Erwachsenen größere Belastungen.

Über die Wirkung von Hydrocortison und Prednisolon wurde in einer Übersicht von LING (40) berichtet. Trotz der lymphozytolytischen Wirkung, die diesen Steroiden in vivo von vielen Autoren zugeschrieben wurde, wurde bei physiologischen Dosen keine deutliche Verminderung der Lymphozyten-Transformation gefunden.

Ein direkter Zusammenhang zwischen der von FISCHER festgestellten Erhöhung der Plasma-Cortisol-Spiegel bei operierten Kindern und der von uns beobachteten postoperativen Lymphozyten-Depression ist nach unserer Meinung nicht gegeben. Die von LING zitierten Untersuchungen über die Wirkung von Hydrocortison und Prednisolon auf mit PHA stimulierte Lymphozyten in vitro zeigen nur dann eine mäßige Lymphozyten-Depression, wenn hohe Steroiddosen den Kulturen beigegeben werden, die therapeutisch in vivo nicht erreicht werden.

Bei unseren Ergebnissen in der Gruppe der Neugeborenen haben wir zwar eine eindeutige Lymphozyten-Depression 1 1/2 bis 3 Stunden nach der Operation gesehen, doch zeigten sich in den Plasma-Cortisol-Bestimmungen von FISCHER keine signifikant erhöhten Spiegel, so daß aus diesem Grunde die Depression bei Neugeborenen nicht auf die Cortisolwirkung zurückzuführen sein dürfte.

Bei unseren Untersuchungen hatten wir nur einen Patienten mit einer hochdosierten Prednisolon-Therapie. Aus dem Verhalten dieser Stimulierungsrate möchten wir keinen Rückschluß auf den Einfluß des Prednisolons auf die Lymphozyten-Transformation ziehen.

Die Folgerungen, die aus der erhöhten postoperativen Infektanfälligkeit insbesondere im Kindesalter resultieren, liegen auf der Hand.

Das Einhalten einer Asepsis im Operationsraum, eine keimarme Pflege in der postoperativen Heilungsphase, die Überwachung der Keime bei bakteriellen Infektionen durch ein leistungsfähiges Labor und die gezielte, ausreichend hohe und lange Antibiotikagabe sind Selbstverständlichkeiten bei kinderchirurgischen Eingriffen. Wichtig sind ebenfalls die Überwachung des Säure-Basen-Haushaltes, die Gabe von Humanalbumin, Gamma-Globulinen und Bluttransfusionen, wenn dieses indiziert ist.

Dieses gilt besonders für Neugeborene, die zwar wie bereits erwähnt immunkompetente Zellen besitzen, aber in Bezug auf sehr viele Keime noch keine Antigen-Erfahrung besitzen. Mit Plazentadurchgängigen Ig G ist das Neugeborene gut ausgestattet, dagegen fehlt weitgehend das Ig M, spezifisch in der Abwehr gegen gram-

negative Keime. Das erklärt teilweise die Unfähigkeit bakteriellen Infektionen mit gramnegativen Keimen zu widerstehen (72).

So wie es heute bereits möglich ist eine Prophylaxe mit Gamma-Globulinen oder mit Hyperimmun-Globulinen bei gefährdeten Patienten zu betreiben, wird es möglicherweise in Zukunft eine Therapie mit Transfer-Faktor oder mit gegen bestimmte Keime sensibilisierte kleine Lymphozyten geben.

G. ZUSAMMENFASSUNG

Der von uns erarbeitete Lymphozyten-Transformations-Test wurde von uns als Suchtest zur Aufdeckung eines Defektes der zellvermittelten Immunität in unsere Klinik eingeführt. Die Auswertung wurde mit dem Liquid-Szintillations-Zähler (gemessen in counts per minute oder cpm) durchgeführt. Die Stimulationsrate in cpm war der Ausdruck der Reaktionsfähigkeit der kleinen Lymphozyten auf die Stimulation mit Phytohämagglutinin.

Bei einem Fall einer schweren kombinierten Immundefizienz vom Schweizer Typ wurde nach Stimulation mit PHA eine Stimulationsrate erreicht, die nahezu dem Kontrollwert ohne PHA-Zusatz entsprach.

In einem Fall einer Sepsis mit Candida albicans und Escherichia coli und in einem Fall einer mucocutanen Candidiasis erhielten wir Stimulationsraten, die nur unwesentlich von den Kontrollwerten abwichen. Diese Ergebnisse zeigen, daß bei Fällen einer Sepsis und einer generalisierten Candidose auch an einen Defekt der zellvermittelten Immunität gedacht werden sollte, wenngleich in allen anderen Fällen mit derselben Diagnose keine Verminderung der Stimulationsrate beobachtet werden konnte.

Neben der Auswertung dieser klinischen Fälle bestand der Schwerpunkt dieser Arbeit in der Untersuchung von 34 Patienten im Alter von 1 Tag bis zu 11 Jahren im Hinblick auf die Reaktionsfähigkeit der kleinen Lymphozyten vor und nach Operationen. 27 Fälle konnten ausgewertet werden. Es konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

In der Gruppe der Neugeborenen ist die geringe Stimulierbarkeit der kleinen Lymphozyten vor der Operation auffällig. In 5 Fällen von 6 war der 1. postoperative Stimulationswert niedriger als vor der Operation. Bei allen übrigen Patienten (6 Säuglingen und 15 Klein- und Schulkindern) war der 1. postoperative Stimulationswert gegenüber dem präoperativen Wert erniedrigt. 3 bis 9 Tage nach der Operation war die Stimulationsrate gegenüber dem präoperativen Wert bei 6 der 7 Säuglinge und bei 12 der 15 älteren Kinder etwa gleich oder erhöht, während die Neugeborenen in dieser Hinsicht unterschiedliche Ergebnisse aufwiesen.

Die Ergebnisse, die mit der Autoradiographie erzielt wurden, wichen nicht wesentlich von den Ergebnissen ab, die wir mit dem Liquid-Szintillations-Zähler erreichten.

Die Schwere und Länge des operativen Eingriffs scheint einen Einfluß auf die Stimulierbarkeit der kleinen Lymphozyten zu haben. Je länger die Operationsdauer und je größer der Blutverlust war, desto geringer war die Stimulierbarkeit der Lymphozyten nach der Operation. Bei 10 von 11 Patienten von unterschiedlichen Altersgruppen mit Operationen von 90 Minuten und länger war der 1. postoperative Stimulationswert erheblich unter den präoperativen Ausgangswert abgesunken (bis maximal 5,8 %). Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von verschiedenen Autoren (54, 60, 62) bei operierten Erwachsenen.

Bluttransfusionen während und unmittelbar nach Operationen wirken sich unterschiedlich auf die Stimulationsfähigkeit kleiner Lymphozyten auf PHA aus.

Die Applikation von Antibiotika hatte auf die Lymphozyten-Stimulation, soweit bei der begrenzten Zahl unserer chirurgischen Patienten beurteilbar, keinen unmittelbaren Einfluß.

Eine eindeutige Korrelation zwischen der herabgesetzten Stimulierbarkeit der kleinen Lymphozyten nach Operationen und einem komplikationsreichen Heilungsverlauf scheint es nicht zu geben.

Die geringere Stimulationsrate korreliert nicht mit der Zahl der Lymphozyten im peripheren Blutbild nach der Operation, sondern scheint durch eine qualitative Veränderung der Lymphozyten bedingt zu sein. Zytochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen der mit PHA inkubierten Lymphozyten könnten die Ursache der postoperativ herabgesetzten Stimulierbarkeit aufdecken.

Wenn man annimmt, daß die Stimulation kleiner Lymphozyten mit dem unspezifischen Mitogen PHA Rückschlüsse auf das immunologische Verhalten zuläßt, sollten gerade in der Kinderchirurgie ständig die Methoden verbessert werden, die die sterilen Kautelen während der Operation und eine optimale postoperative Versorgung gewährleisten.

LITERATURVERZEICHNIS

(1) Ambs, E., J. Chesebro und B. Lagerlöf: Zur Darstellung der Transformationsmöglichkeit von Lymphocytenkulturen bei verschiedenen Erkrankungen mittels Feulgen-Zytophotometrie. Acta haemat. 41, 276 (1969)

(2) Bach, F. H. and Hirschhorn, K.: The in vitro immune response of peripheral blood lymphocytes. SemHaemat. 2, 68 (1965)

(3) Bain, B. and L. Lowenstein: Genetic studies on the mixed leucocyte reaction. Science 145, 1315 (1964)

(4) Burr, C.: Untersuchungen zur spezifischen zellulären Immunität bei Neugeborenen. Dissertation Univ. München 1973

(5) Caron, G. A.: Lymphocytes and drug hypersensitivity. Lancet, II, 1081 (1966)

(6) Carstairs, K.: Transformation of the small lymphocyte in culture. Lancet II, 984 (1961)

(7) Cooper, M. D., A. E. Gabrielsen and R. A. Good: Roll of thymus and other central lymphoid tissues in immunological disease. Ann. Rev. Med. 18, 113 (1967)

(8) Cooper, H. L. and Rubin, A. D.: Synthesis of nonribosomal RNS by lymphocytes: A response to phytohemagglutinin treatment. Science 152, 516 (1966)

(9) Doniach, J. and S. R. Pelc: Autoradiograph technic. Brit. J. Radiol. 23, 184 (1950)

(10) Elves, M. W.: The effect of phytohemagglutinin on lymphoid cells; in Elves 'The Biological Effects of Phytohemagglutinin', pp. 11 - 26 (The Robert Jones and Agnes Hunt Orthopaedic Management Committee, Oswestry, England 1966)

(11) Elves, M. W., S. Roath and M. C. G. Israels: The response of lymphocytes to antigen challenge in vitro. Lancet, I, 806 (1963)

(12) Farnes, P., Barker, B. E., L. E. Brownhill et al.: Mitogenic activity in Phytolacca Americana (Pokeweed). Lancet, II, 1100 (1964)

(13) Fischer, H. A.: Der Plasmaspiegel des Cortisols und Corticosterons im Stress. Dissertation Univ. München (1971)

(14) Furth van, R.: Mononuclear Phagocytes. Blackwell Scientific Publications, Oxford a. Edinburgh (1970)

(15) Gey, W.: Kursus über Autoradiographie von Chromosomen nach Markierung mit ^{3}H-Thymidin. Vorgetragen auf der 9. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Anthropologie in Freiburg i. Br. 1965

(16) Gowans, J. L. and D. D. McGregor: The lymphocyte. Progress in Allergy Vol. 9, 1 (1965). S. Karger, Basel, New York

(17) Graesbeck, R., C. Nordman and A. De la Chapelle: Mitogenic action of antilymphocyte immune serum on peripheral leucocytes in vitro. Lancet, II, 385 (1963)

(18) Halpern, B., N. T. Ky, N. Amache et al.: Diagnostic de l´allergie médicamenteuse "in vitro" par l´utilisation du test de transformation lymphoblastique (T. T. L.). La Presse Médicale, 75, 461 (1967)

(19) Hecker, Ch., W. Marget und G. L. Haberland: Antibiotika- und Trasyloltherapie in Pädiatrie und Kinderchirurgie. Urban und Schwarzenberg, München (1971)

(20) Heilman, D. and McFarland, W.: Cellular interaction during antigen-induced blastogenesis in leucocytescultures. Fed. Proc. 26, 528 (1967)

(21) Heitmann, H. J.: Fluorescence and Blast Transformation. Lancet, II, 419 (1967)

(22) Herbert, W. I. and P. C. Wilkinson: A dictionary of immunology. Blackwell Scientific Publications, Ltd., Oxford (1971)

(23) Higgs, J. M. und Wells, R. S.: Klassifizierung der chronischen mucocutanen Candidiasis mit Betrachtung zum klinischen Bild und zur Therapie. Hautarzt 25, 159 (1974)

(24) Hirschhorn, K., F. Bach, R. L. Kolodny et al.: Immune response and mitosis of human peripheral blood lymphocytes "in vitro". Science 142, 1185 (1963)

(25) Hirschhorn, K., M. Bloch-Shtacher and J. W. Uhr: Stimulation of nonimmunized human leucocytes by antigen-antibody complexes. J. Clin. Invest. 46, 1070 (1967)

(26) Hollmann, G.: Experimentelle Untersuchungen zur Pathophysiologie des hämorrhagischen Schocks im frühen Lebensalter. Habilitationsschrift Univ. München (1971)

(27) Humphrey, J. H. and R. C. White: Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1971)

(28) Hungerford, D. A., A. I. Donelli, P. C. Nowell and S. Beck: The chromosome constitution of human phenotype intersex. Amer. J. Hum. Gen. 11, 215 (1959)

(29) Hurn, B. A. L.: Preparation and partial characterisation of the mitogenic principle from Phaseolus vulgaris seeds. In: The biological effects of phytohaemagglutinin. The Robert Jones and Agnes Hunt orthopaedic hospital management committee. Oswestry, England pp. 83 - 95 (1966)

(30) Imman, D. R. and E. H. Cooper: Electron microscopy of human lymphocytes. Nature 210, 919 (1966)

(31) Johnson, G. J. and P. S. Russell: Reaction of human lymphocytes in culture to components of the medium. Nature 208, 343 (1965)

(32) Jones, A. L.: The effect of polymorphonuclear leucocytes in mixed leucocyte cultures. Transplant. Bull. 4, 337 (1966)

(33) Junge, U., J. Hoekstra, L. Wolfe and F. Deinhardt: Microtechnique for quantitive evaluation of in vitro lymphocyte transformation. Clin. exp. Immunol. 7, 431 (1970)

(34) Kallos, P. and B. H. Waksman: Progress in Allergy. S. Karger, Basel (1968)

(35) Kay, J. E.: Role of ribosomal RNA (rRNA) synthesis in the effects of phytohaemagglutinin (PHA) on lymphocytes. Pathology, Fed. Proc. 27, 717 (1968)

(36) Knight, S. and N. R. Ling: A comparison of the responses of lymphocytes from blood, spleen, thymus and appendix of rabbits of different ages to stimulation in vitro with staphylococcal filtrate. Clin. exp. Immunol. 4, 667 (1969)

(37) Landsteiner, K.: The specificity of serological reactions. C. Ch. Thomas, Springfield, Ill. (1936)

(38) Lawrence, H. S.: Transfer factor and cellular immune deficiency disease. N. Engl. J. Med. 283, 411 (1970)

(39) Levis, W. R. and J. H. Robbins: Effect of glass-adherent cells on the blastogenic response of "purified" lymphocytes to phytohaemagglutinin. Exp. Cell. Res. 61, 153 (1970)

(40) Ling, N. R.: Lymphocyte stimulation. North Holland Publishing Comp. Amsterdam (1968)

(41) Ling, N. R., E. Spicere, K. James et al.: The activation of human peripheral lymphocytes by products of Staphylococci. Brit. Journal of Haematology 11, 421 (1965)

(42) Ling, N. R. and J. E. Kay: Lymphocyte stimulation. North Holland Publishing Comp. Amsterdam (1975)

(43) Lischka, G.: Lymphocytentransformationstest bei Chromallergie. Arch. Derm. Forsch. 240, 212 (1971)

(44) Lycette, R. R. and G. E. Pearman: Further observations on antigeninduced mitosis. Lancet, II, 386 (1963)

(45) Mc Farland, W.: Factors affecting the immunological reactivity of human lymphocytes "in vitro". II. "Pure" lymphocytes versus total leucocytes. Proc. 3rd ann. Leucocyte Culture Conference p. 77. Appleton-Century-Crofts. New York

(46) Mellmann, W. J.: Human Peripheral Blood Leucocyte Culture. In: Yunis, J. J.: Human Chromosome Methodology. Academic Press, New York and London (1965)

(47) Michalowski, A., W. Bartoszewicz and J. Kozubowski: Blastic transformation in leucocyte cultures. Lancet, II, 1130 (1966)

(48) Moeller, G.: Induction of DNA synthesis in normal human lymphocyte cultures by antigen-antibody complexes. Clin. Exp. Immunol. 4, 65 (1969)

(49) Naspitz, C. K., A. H. Eisen and M. Richter: DNA synthesis in vitro in leucocytes from patients with ataxia teleangiectasia. Int. Arch. Allergy, in press, (zitiert nach Progress in Allergy Vol. 12 p. 62)

(50) Nowell, P. C.: Phytohaemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes. Cancer Res. 20, 462 (1960)

(51) Oppenheim, J. J., E. M. Hersh and J. B. Block: The response to various stimuli of human peripheral lymphocytes which have been ´purified´ by passage through glass bead columns. In: Elves ´The Biological Effects´ usw. wie Nr. 10

(52) Oppenheim, J. and S. Perry: Effects of endotoxins on cultures leucocytes. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 118, 1014 (1965)

(53) Oppenheim, J. J., J. Whang and E. Frei: Immunologic and cytogenetic studies of chronic lymphocytic leukemia cells. Blood 26, 121 (1965)

(54) Park, S. K., J. I. Brody, H. A. Wallace, W. S. Blakemore: Immunsuppressive effect of surgery. Lancet, I, 63 (1971)

(55) Parrot, D. M. V. and M. A. B. Sousa: Changes in the thymus-dependent areas of lymph nodes after immunological stimulation. Nature 212, 1316 (1966)

(56) Pearmain, G., R. R. Lycette and P. H. Fitzgerald: Tuberkulin-induced mitosis in peripheral blood leucocytes. Lancet, I, 637 (1963)

(57) Pfeiffer, R. A.: Methoden in der medizinischen Cytogenetik. Edit. Schwarzacher, H. G. und Wolf, U. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1970)

(58) Riddle, P. R., M. C. Berenbaum: Postoperative depression of the lymphocyte response to phytohaemagglutinin. Lancet, I, 746 (1967)

(59) Rigas, D. A. and E. E. Osgood: Purification and properties of phytohaemagglutinin of Phaseolus vulgaris. J. Biol. Chem. 212, 607 (1955)

(60) Roitt, I. M.: Essential immunology. Blackwell Scientific Publications, Ltd., Oxford (1971)

(61) Sarkany, I.: Lymphocyte transformation in drug hypersensitivity. Lancet, I, 743 (1967)

(62) Slade, M. S., R. L. Simmons, E. Yunis and L. J. Greenberg: Immundepression after major surgery in normal patients. Surgery, Vol. 78, No. 3, 363 (1975)

(63) Schechter, G. P., F. Soehnlein, W. Mc Farland: Lymphocyte response to blood transfusion in man. N. Engl. J. Med. 287, 1169 (1972)

(64) Scheiffarth, F. und H. Warnatz: Lymphocytentransformationstest. Eine neue Methode in der Diagnostik der primär chronischen Polyarthritis. Med. Klin. 63, 1808 (1968)

(65) Schellekens, P. Th. A. and V. P. Eijsvogel: Lymphocyte transformation in vitro. I. Tissue culture conditions and quantitative measurements. Clin. exp. Immunol. 3, 517 (1968)

(66) Scherwitz, C.: Candida-Erkrankungen von Haut und Schleimhaut. Med. Klin. 71, 1172 (1976)

(67) Schrek, R. and Y. Rabinowitz: Effects of phytohaemagglutinin on rat and normal and leukemic human blood cells. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 113, 191 (1963)

(68) Scothorne, R. J.: Studies on the response of the regional lymphnode to skin homografts. Ann. N. Y. Acad. Sci. 64, 1028 (1957)

(69) Sell, S., D. S. Rowe and P. G. H. Gell: Studies on rabbit lymphocytes in vitro. III. Protein, RNA and DNA synthesis by lymphocyte cultures after stimulation with phytohaemagglutinin, with staphylococcal filtrate, with antiallotype serum, and with heterologous antiserum to rabbit whole serum. J. Exp. Med. 122, 823 (1965)

(70) Sørensen, S. F., V. Andersen and J. Giese: Studies on the quantitation of lymphocyte response in vitro. Acta path. micr. Scan. 76, 259 (1969)

(71) Stewart, C. C. and M. Ingram: A Method for counting Phytohaemagglutinin-stimulated lymphocytes. Blood 29, 628 (1967)

(72) Stiehm, E. R. and V. A. Fulginati: Immunologic Disorders in Infants and Children. W. B. Saunders Company, Philadelphia (1973)

(73) Swenson, O.: Pediatric Surgery Vol. 1. Butterworths London, Meredith Corp. New York (1969)

(74) Tin Han: Postoperative immunosuppression in patients with breast cancer. Lancet, I, 742 (1972)

(75) Turk, J. L.: Cytology of the induction of hypersensitivity. Brit. med. Bull. 23, 3 (1967)

(76) Uhr, J. W.: Delayed hypersensitivity. Physiol. Rev. 46, 359 (1966)

(77) Vandam, L. D. and F. D. Moore: Adrenocortical mechanismus related to anesthesia. Anesth. 21, 531 (1960)

(78) Vlasin, Z., R. Neth, H. Schmidtke, H. Beckmann und G. Heller: Mikrochemischer Schnellnachweis der Lymphocyten-Transformation, Kinetik der RNS-Synthese in Abhängigkeit von der Phytohaemagglutinin-Konzentration. Klin. Wschr. 48, 56 (1969)

(79) Weiner, M. S., W. J. Waithe and K. Hirschhorn: L-Asparagenase and blastogenesis. Lancet, II, 748 (1969)

(80) Yoffey, J. M., G. C. B. Winter, D. G. Osmond and E. S. Meck: Morphological studies in the culture of human leucocytes with phytohaemagglutinin. Brit. J. Haemat. 11, 488 (1965)

Herr Professor Dr. W. Marget hat mir freundlicherweise das Thema überlassen und zur Durchführung der Versuche die Einrichtungen seines Institutes zur Verfügung gestellt. Dafür und für die vielfältigen Anregungen bin ich ihm sehr zu Dank verpflichtet.

Herr Professor Dr. B. Stück hat die Arbeit übernommen. Ihm bin ich für wertvolle Anregungen bei der inhaltlichen und formalen Gestaltung und für die Übernahme der Arbeit dankbar.

Herrn Professor Dr. Ch. Hecker, Chefarzt der Kinderchirurgischen Universitätsklinik München, danke ich für die Überlassung des Krankengutes und für zahlreiche kritische Anregungen.

Bei der Durchführung der Experimente stand mir mit Rat und Tat Herr Dr. med. B. Belohradsky zur Seite. Dafür möchte ich ihm herzlich danken.

Ebenso gilt mein Dank allen medizinisch-technischen Assistentinnen der Abteilung für Antimikrobielle Therapie und Infektionsimmunologie, insbesondere Frau Roos, die mir bei den Versuchen behilflich waren.

Lebenslauf

Am 7. September 1942 wurde ich als ältestes von 3 Kindern des Studienassessors Johannes Alberti und seiner Ehefrau Elfriede, geb. Götze, in Quedlinburg geboren. Nach meiner Grundschulzeit in einem Dorf bei Leipzig übersiedelte ich 1952 nach Dortmund und besuchte dort ab 1953 das neusprachliche Humboldt-Gymnasium. 1962 bestand ich dort das Abitur und absolvierte zunächst ein 2-jähriges Apotheker-Praktikum, das 1964 mit dem pharmazeutischen Vorexamen abschloß. Den anschließenden freiwilligen 2-jährigen Wehrdienst beendete ich 1966 als Leutnant d. R. einer Panzereinheit der Gebirgsdivision.

Im gleichen Jahr begann ich an der Ludwig-Maximilian-Universität in München mit dem Medizinstudium, wo ich Ende 1972 das Staatsexamen bestand. Zwischendurch hatte ich im Wintersemester 70/71 in Wien studiert.

Während der Medizinalassistentenzeit arbeitete ich an verschiedenen Würzburger und Berliner Kliniken. 1973 heiratete ich die Assistenzärztin Dr. Isolde Alberti und habe seit Februar 1977 eine Tochter.

1974 wurde mir die Approbation als Arzt erteilt. Anschließend hatte ich 4 Monate eine Vertreterstelle in der Hautklinik Berlin-Britz inne. 1974/75 wurde mir vom Senator für Gesundheit und Umweltschutz eine befristete Stelle in der I. Medizinischen Abteilung des Rudolf-Virchow-Krankenhauses bewilligt. Seit dem 1. Oktober 1975 bin ich in demselben Haus in der Röntgen- und Strahlenabteilung (Chefarzt Prof. Dr. H. Witt) als Assistenzarzt tätig und strebe den Facharzt für Radiologie an.